

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2001 年 7 月 5 日 (05.07.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/48203 A1

- (51) 国際特許分類: C12N 15/12, C07K 14/475, 16/18, A61K 38/17, 45/00, A61P 19/00, 19/02, 43/00, 1/00, 35/00, G01N 33/53, 33/50, 33/15 36番地 16 Ibaraki (JP). 西 一紀 (NISHI, Kazunori) [JP/JP]; 〒305-0044 茨城県つくば市並木4丁目16番地1 ガーデンヒルズ並木402号 Ibaraki (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP00/09236 (74) 代理人: 弁理士 高橋秀一, 外(TAKAHASHI, Shuichi et al.); 〒532-0024 大阪府大阪市淀川区十三本町2丁目17番85号 武田薬品工業株式会社 大阪工場内 Osaka (JP).
- (22) 国際出願日: 2000 年 12 月 26 日 (26.12.2000)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願平 11/369946 1999 年 12 月 27 日 (27.12.1999) JP
特願2000/45124 2000 年 2 月 17 日 (17.02.2000) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 武田薬品工業株式会社 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.) [JP/JP]; 〒541-0045 大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号 Osaka (JP).
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CN, CR, CU, CZ, DM, DZ, EE, GD, GE, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LT, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, US, UZ, VN, YU, ZA.
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 伊藤康明 (ITO, Yasuaki) [JP/JP]; 〒300-0832 茨城県土浦市桜ヶ丘町
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書

[続葉有]

(54) Title: NOVEL PROTEIN AND DNA THEREOF

(54) 発明の名称: 新規タンパク質およびそのDNA

(57) Abstract: A novel protein and a DNA encoding the same which are usable as remedies/preventives for diseases such as diseases in bone, cartilage or joint, cancer (malignant tumor), pathologic angiogenesis other than the above ones, organ insufficiency, digestive tract failure and exocrine secretion failure. This protein is also useful as a reagent in screening a compound or its salt promoting or inhibiting the activity of this protein. Moreover, an antibody against this protein, which can recognize specifically this protein, is usable in, for example, quantifying the protein in a liquid sample.

(57) 要約:

本発明のタンパク質およびそれをコードするDNAは、例えば、骨・軟骨・関節疾患、癌（悪性腫瘍）、前記以外の病的血管新生、臓器不全、消化管障害、外分泌障害などの疾病の治療・予防剤として使用することができる。また、本発明のタンパク質は、本発明のタンパク質の活性を促進もしくは阻害する化合物またはその塩のスクリーニングのための試薬として有用である。さらに、本発明のタンパク質に対する抗体は、本発明のタンパク質を特異的に認識することができるので、被検液中の本発明のタンパク質の定量などに使用することができる。

WO 01/48203 A1



2文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

明 細 書

新規タンパク質およびそのDNA

5 技術分野

本発明は新規な細胞制御因子タンパク質に関する。

背景技術

10 生体は、細胞間または組織間で、互いに情報伝達をすることにより、発生、分化、増殖、恒常性の維持などの統合の取れた調節を行っている。多くの場合、タンパク性因子がそれらの仲立ちをしている。例えば、免疫系、造血系に関与する分泌性因子（液性因子）が数多く見いだされていて、それらはサイトカインと呼ばれている。リンホカイン、モノカイン、インターフェロン、コロニー刺激因子、腫瘍壊死因子などがこれらに含まれる。

15 また、液性因子には、その前駆体タンパク質に典型的分泌シグナル配列が存在しなくても、膜タンパク質として合成された後に、プロテアーゼによる限定分解を受けて成熟型として切り出されるものもある。その代表的な例として、コンドロモジュリン-I (Chondromodulin-I; 以下、ChM-I と略す) が挙げられる。ChM-I は、1991年に軟骨細胞の増殖・分化をモジュレートする因子としてウシ胎仔軟骨から精製された約25 kDa
20 の糖タンパク質である。その前駆体cDNAは335個のアミノ酸からなるタンパク質をコードしており、そのN末端付近には膜貫通領域が存在し、まずChM-I 前駆体が糖鎖の結合した膜タンパク質として合成された後に、プロセシング・シグナル (Arg-Glu-Arg-Arg) で切断され、C末端部にコードされる
25 121個の成熟ChM-I が産生されると推定されている [Biochem. Biophys. Res. Commun., Vol. 175, p. 971-977 (1991)]。また、ChM-I はウシ以外の各種哺乳動物からも相同遺伝子がクローニングされており、ヒトChM-I もクローニングされている [Eur. J. Biochem., Vol. 260, p. 869-878 (1999)]。

ChM-I は、元々、塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) の軟骨細胞に
30 対する相乗的なDNA合成促進活性を指標にウシ胎仔軟骨から精製された軟

骨における機能性マトリクスタンパク質の一つであるが、後に軟骨における血管内皮細胞の増殖と管腔形成を阻害する血管新生抑制因子であることが明らかにになった〔ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (The Journal of Biological Chemistry) 272巻、32419-32426頁(1997)]。

- 5 さらに、最近になって軟骨肉腫組織でのChM-I mRNAの発現レベルが正常軟骨組織より著しく低下していることが判明し、軟骨肉腫における血管侵入抵抗性の消失に深く関与していることが示唆された他、ヒト軟骨肉腫細胞株や大腸癌細胞株のヌードマウスへの移植モデルで、ヒト組換えChM-Iの局所投与が腫瘍血管新生、腫瘍造成を顕著に阻害することがわかり、ChM-I
- 10 の抗腫瘍因子としての可能性も論じられている〔フェブス・レターズ (FEBS Letters) 458巻、436-440頁(1999)]。

- ChM-Iは、上述のようにこれまで種間を越えてその遺伝子が発見されてきているが、他のサイトカイン、例えば腫瘍壊死因子 (Tumor Necrosis Factor, TNF) ファミリーに見られるような、いわゆる構造面からのファミリーを形成
- 15 するような他の遺伝子の存在は知られていなかった。しかし、軟骨細胞特異的に発現し、その増殖・分化の制御を司るChM-Iのような局所性因子が、生体内に他に存在する可能性は否定されている訳では決してなく、むしろそうしたユニークな基本構造を有する未知の因子がさらに重要な生理機能を担い、ひいては発生、分化、増殖、恒常性の維持などの統合の取れた調節を行っている
- 20 と考えられる。また、医薬研究開発の側面からもそのような内因性因子はこれまで知られている作用機序とは異なる全く新しい医薬そのもの、あるいはその標的因子を提供する可能性が大きいことから、こうした範疇に含まれる新規細胞制御因子タンパク質が望まれていた。

- 本発明は、生物学、医学、獣医学などに利用可能な新規タンパク質、その部分ペプチド、またはそれらの塩、組換えベクター、形質転換体、該タンパク質
- 25 の製造法、該タンパク質または部分ペプチドを含有する医薬、および該タンパク質などに対する抗体を提供することを目的とする。

発明の開示

- 30 本発明者らは、上記の課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、ヒト胎

児などで多く発現している新規な塩基配列を有する cDNA を発見することに成功し、それにコードされるタンパク質が、新しい細胞制御因子タンパク質であることを見出し、かかるタンパク質をヒト NCHM (New Chondromodulin-I) と命名した。本発明者らは、これらの知見に基づいて、さらに検討を重ねた結果、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、

- (1) 配列番号：1 で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩、
- (2) 上記 (1) 記載のタンパク質の部分ペプチドまたはその塩、
- 10 (3) 配列番号：2 で表わされるアミノ酸配列を有する上記 (2) 記載の部分ペプチドまたはその塩、
- (4) 配列番号：3 で表わされるアミノ酸配列を有する上記 (2) 記載の部分ペプチドまたはその塩、
- (5) 上記 (1) 記載のタンパク質または上記 (2) 記載の部分ペプチドをコードする DNA を含有する DNA、
- 15 (6) 配列番号：4 で表される塩基配列を含有する上記 (5) 記載の DNA、
- (7) 配列番号：5 で表される塩基配列を含有する上記 (5) 記載の DNA、
- (8) 配列番号：6 で表される塩基配列を含有する上記 (5) 記載の DNA、
- (9) 上記 (1) 記載のタンパク質または上記 (2) 記載の部分ペプチドをコードする DNA を含有する組換えベクターで形質転換された形質転換体、
- 20 (10) 上記 (1) 記載のタンパク質または上記 (2) 記載の部分ペプチドをコードする DNA を含有する組換えベクターで形質転換された形質転換体を培養し、該タンパク質または該部分ペプチドを生成せしめることを特徴とする、上記 (1) 記載のタンパク質もしくは上記 (2) 記載の部分ペプチドまたはその塩の製造法、
- 25 (11) 上記 (1) 記載のタンパク質もしくは上記 (2) 記載の部分ペプチドまたはその塩に対する抗体、
- (12) 上記 (1) 記載のタンパク質もしくは上記 (2) 記載の部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする、上記 (1) 記載のタンパク質もしくは
- 30 上記 (2) 記載の部分ペプチドまたはその塩の活性を促進または阻害する化

合物またはその塩のスクリーニング方法、

(13) 上記(1)記載のタンパク質もしくは上記(2)記載の部分ペプチドまたはその塩を含有してなる、上記(1)記載のタンパク質もしくは上記(2)記載の部分ペプチドまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット、

(14) 上記(12)記載のスクリーニング方法または上記(13)記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、上記(1)記載のタンパク質もしくは上記(2)記載の部分ペプチドまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩、

(15) 上記(12)記載のスクリーニング方法または上記(13)記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、上記(1)記載のタンパク質もしくは上記(2)記載の部分ペプチドまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩を含有してなる医薬、

(16) 上記(11)記載の抗体を含有してなる診断剤、

(17) 上記(1)記載のタンパク質もしくはその塩または上記(2)記載の部分ペプチドもしくはその塩を含有してなる医薬、

(18) 骨・軟骨・関節疾患、癌、病的血管新生、胎児発育不全、臓器不全、消化管障害または外分泌障害の治療・予防剤である上記(17)記載の医薬、

(19) 上記(1)記載のタンパク質もしくはその塩または上記(2)記載の部分ペプチドもしくはその塩を投与することを特徴とする骨・軟骨・関節疾患、癌、病的血管新生、胎児発育不全、臓器不全、消化管障害または外分泌障害の治療・予防方法、

(20) 上記(1)記載のタンパク質もしくはその塩または上記(2)記載の部分ペプチドもしくはその塩を含有してなる骨・軟骨・関節疾患、癌、病的血管新生、胎児発育不全、臓器不全、消化管障害または外分泌障害の治療・予防剤を製造するための上記(1)記載のタンパク質もしくはその塩または上記(2)記載の部分ペプチドもしくはその塩の使用などを提供する。

さらには、本発明は、

(21) 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列が、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と約50%以上（好ましくは約

60%以上、さらに好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%以上、特に好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上)の相同性を有するアミノ酸配列である上記(1)記載のタンパク質またはその塩、

(22) 配列番号: 1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列が、①配列番号: 1で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上(好ましくは、1~30個程度)のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、②配列番号: 1で表わされるアミノ酸配列に1または2個以上(好ましくは、1~30個程度)のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、③配列番号: 1で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上(好ましくは、1~30個程度)のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または④それらを組み合わせたアミノ酸配列である上記(1)記載のタンパク質またはその塩、

(23) 上記(1)記載のタンパク質または上記(2)記載の部分ペプチドをコードするDNAを含有する組換えベクター、

(24) 組織または臓器再生補助剤である上記(17)記載の医薬などを提供する。

さらに本発明は、分子量マーカー、組織マーカー、染色体マッピング、遺伝病の同定、プライマー、プローブの設計などの基礎研究に利用できるのみならず、がん転移阻害、がん転移の検出、細胞の分化増殖の調節、サイトカインの誘導、造血調節、血液凝固調節、感染症、代謝調節、創傷火傷治癒、抗炎症、胎児発育不全、遺伝子治療などの分野で、各種疾病の治療または予防目的で利用できる可能性がある。さらには、消化管障害(例、潰瘍性大腸炎、過敏性腸症候群、クローン病)、外分泌障害(例、シェーグレン症候群、膵嚢胞繊維症)などの疾病に対する治療または予防目的で利用できる可能性がある。

25 図面の簡単な説明

図1は、実施例1で得られた本発明のタンパク質をコードするDNAの塩基配列および該塩基配列から推定されるアミノ酸配列を示す。図は、ベクターDNAのEcoRI認識部位より挿入配列側を示す。

図2は、ヒトNCHMタンパク質と既知各種コンドロモジュリンI前駆体タンパク質との相同性を示す。図中、Nchm.proはヒトNCHMタンパク質を、

CHM1_HUMAN.pro はヒトコンドロモジュリン I 前駆体タンパク質を、
CHM1_BOVIN.pro はウシコンドロモジュリン I 前駆体タンパク質を、
CHM1_RABBIT.pro はウサギコンドロモジュリン I 前駆体タンパク質を、
CHM1_RAT.pro はラットコンドロモジュリン I 前駆体タンパク質をそれぞれ示
5 す（図 3 につづく）。

図 3 は、ヒト NCHM タンパク質と既知各種コンドロモジュリン I 前駆体タンパク質との相同性を示す（図 2 のつづき）。

発明を実施するための最良の形態

10 本発明の配列番号：1 で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質（以下、本発明のタンパク質と称する場合がある）は、胎児を含むヒト、温血動物（例えば、モルモット、ラット、マウス、ニワトリ、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど）の細胞（例えば、肝細胞、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、膵臓 β 細胞、骨髓細胞、メサングウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、内皮細胞、繊維芽細胞、
15 繊維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞（例、マクロファージ、T 細胞、B 細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球、樹状細胞）、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくはガン細胞など）もしくはそれらの細胞が存在するあらゆる組織、例えば、脳、脳の各部位（例、嗅球、扁桃核、大脳基底核、海馬、視床、視床下部、大脳皮質、延髄、小脳）、脊髓、下垂体、胃、膵臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髓、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管（例、大腸、小腸）、血管、心臓、胸腺、脾臓、唾液腺、末梢血、前立腺、睾丸、卵巣、胎盤、子宮、骨、軟骨、
20 関節、骨格筋などに由来するタンパク質であってもよく、組換えタンパク質であってもよく、合成タンパク質であってもよい。

配列番号：1 で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、配列番号：1 で表わされるアミノ酸配列と約 50 % 以上、好ましくは約 60 % 以上、さらに好ましくは約 70 % 以上、より好ましくは約 80 % 以上、
30 特に好ましくは約 90 % 以上、最も好ましくは約 95 % 以上の相同性を有する

アミノ酸配列などが挙げられる。

本発明の配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質としては、例えば、前記の配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有し、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を有するタンパク質と実質的に同質の性質を有するタンパク質などが好ましい。

実質的に同質の性質としては、例えば、血管新生抑制作用などが挙げられる。実質的に同質とは、それらの性質が定性的に同質であることを示す。したがって、血管新生抑制作用などの性質が同等（例、約0.1～100倍、好ましくは約0.5～10倍、より好ましくは0.5～2倍）であることが好ましいが、これらの性質の程度、タンパク質の分子量などの量的要素は異なってもよい。

また、本発明のタンパク質としては、例えば、①配列番号：1で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、②配列番号：1で表わされるアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、③配列番号：1で表わされるアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列、④配列番号：1で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または⑤それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有するタンパク質などのいわゆるムテインも含まれる。

上記のようにアミノ酸配列が挿入、欠失または置換されている場合、その挿入、欠失または置換の位置としては、特に限定されない。

本明細書におけるタンパク質は、ペプチド標記の慣例に従って左端がN末端（アミノ末端）、右端がC末端（カルボキシル末端）である。配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質をはじめとする、本発明のタン

パク質は、C末端が通常カルボキシル基（ $-\text{COOH}$ ）またはカルボキシレート（ $-\text{COO}^-$ ）であるが、C末端がアミド（ $-\text{CONH}_2$ ）またはエステル（ $-\text{COOR}$ ）であってもよい。

ここでエステルにおけるRとしては、例えば、メチル、エチル、 n -プロピル、イソプロピルもしくは n -ブチルなどの C_{1-6} アルキル基、例えば、シクロペンチル、シクロヘキシルなどの C_{3-8} シクロアルキル基、例えば、フェニル、 α -ナフチルなどの C_{6-12} アリール基、例えば、ベンジル、フェネチルなどのフェニル- C_{1-2} アルキル基もしくは α -ナフチルメチルなどの α -ナフチル- C_{1-2} アルキル基などの C_{7-14} アラルキル基のほか、経口用エステルとして汎用されるピバロイルオキシメチル基などが用いられる。

本発明のタンパク質がC末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレート）を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本発明のタンパク質に含まれる。この場合のエステルとしては、例えば上記したC末端のエステルなどが用いられる。

さらに、本発明のタンパク質には、N末端のアミノ酸残基（例、メチオニン残基）のアミノ基が保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などの C_{1-6} アルカノイルなどの C_{1-6} アシル基など）で保護されているもの、生体内で切断されて生成するN末端のグルタミン残基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基（例えば $-\text{OH}$ 、 $-\text{SH}$ 、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など）が適当な保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などの C_{1-6} アルカノイル基などの C_{1-6} アシル基など）で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖タンパク質などの複合タンパク質なども含まれる。

本発明のタンパク質の具体例としては、例えば、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を有するヒト由来のタンパク質などが挙げられる。

本発明のタンパク質の部分ペプチド（以下、本発明の部分ペプチドと称する場合がある）としては、前記した本発明のタンパク質の部分ペプチドであって、好ましくは、前記した本発明のタンパク質と同様の性質を有するものであればいずれのものでもよい。例えば、本発明のタンパク質の構成アミノ酸配列のうち少なくとも5個以上、好ましくは20個以上、さらに好ましくは30個以上、

より好ましくは50個以上、最も好ましくは80個以上のアミノ酸配列を有するペプチドなどが用いられる。

これらペプチドの中でも、例えば、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列の49番目～317番目のアミノ酸配列（配列番号：2）と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有し、本発明のタンパク質と実質的に同質の性質を有するペプチドなどが好ましい。さらに好ましくは、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列の215番目～317番目のアミノ酸配列（配列番号：3）と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有し、本発明のタンパク質と実質的に同質の性質を有するペプチドなどがあげられる。また、例えば、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列の①1番目～289番目、②625番目～951番目、③1番目～640番目、④1番目～721番目、⑤1番目～744番目、または⑥1番目～765番目のアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有し、本発明のタンパク質と実質的に同質の性質を有するペプチドなどもあげられる。ここで、「実質的に同質の性質」とは、前記と同意義を示す。

また、本発明の部分ペプチドは、そのアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が欠失し、または、そのアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～20個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が付加し、または、そのアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～20個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が挿入され、または、そのアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～10個程度、より好ましくは数個、さらに好ましくは1～5個程度）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されていてもよい。

また、本発明の部分ペプチドはC末端が通常カルボキシル基（ $-\text{COOH}$ ）またはカルボキシレート（ $-\text{COO}^-$ ）であるが、C末端がアミド（ $-\text{CONH}_2$ ）またはエステル（ $-\text{COOR}$ ）であってもよい。また、本発明の部分ペプチドがC末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレート）を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本発明の部分ペプチドに含まれる。この場合のエステルとしては、例えば上記したC

末端のエステルなどが用いられる。

さらに、本発明の部分ペプチドには、N末端のアミノ酸残基（例、メチオニン残基）のアミノ基が保護基で保護されているもの、N端側が生体内で切断され生成したグルタミン残基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基が適当な保護基で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合
5 したいわゆる糖ペプチドなどの複合ペプチドなども含まれる。

本発明の部分ペプチドは抗体作成のための抗原として用いることができるので、必ずしも本発明のタンパク質が有する活性を有する必要はない。

本発明のタンパク質または部分ペプチドの塩としては、生理学的に許容される酸（例、無機酸、有機酸）や塩基（例、アルカリ金属塩）などとの塩が用い
10 られ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、
15 ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。

本発明のタンパク質、部分ペプチドまたはそれらの塩は、前述したヒトや温血動物の細胞または組織から自体公知のタンパク質の精製方法によって製造することもできるし、後述するタンパク質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによっても製造することができる。また、後述のペプチ
20 ド合成法に準じて製造することもできる。

ヒトや哺乳動物の組織または細胞から製造する場合、ヒトや哺乳動物の組織または細胞をホモジナイズした後、酸などで抽出を行ない、該抽出液を逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーを組み合わせるにより精製単離することができる。

本発明のタンパク質、部分ペプチドまたはそれらのアミド体、またはそれらの塩の合成には、通常市販のタンパク質合成用樹脂を用いることができる。そのような樹脂としては、例えば、クロロメチル樹脂、ヒドロキシメチル樹脂、ベンズヒドリルアミン樹脂、アミノメチル樹脂、4-ベンジルオキシベンジルアルコール樹脂、4-メチルベンズヒドリルアミン樹脂、PAM樹脂、4-ヒ
30 ドロキシメチルメチルフェニルアセトアミドメチル樹脂、ポリアクリルアミド

樹脂、4-(2', 4'-ジメトキシフェニル-ヒドロキシメチル)フェノキシ樹脂、4-(2', 4'-ジメトキシフェニル-Fmocアミノエチル)フェノキシ樹脂などを挙げるができる。このような樹脂を用い、 α -アミノ基と側鎖官能基を適当に保護したアミノ酸を、目的とするタンパク質またはペプチドのアミノ酸配列通りに、自体公知の各種縮合方法に従い、樹脂上で縮合させる。反応の最後に樹脂からタンパク質を切り出すと同時に各種保護基を除去し、さらに高希釈溶液中で分子内ジスルフィド結合形成反応を実施し、目的のタンパク質もしくは部分ペプチドまたはそれらのアミド体を取得する。

上記した保護アミノ酸の縮合に関しては、タンパク質合成に使用できる各種活性化試薬を用いることができるが、特に、カルボジイミド類がよい。カルボジイミド類としては、DCC、N, N'-ジイソプロピルカルボジイミド、N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロリル)カルボジイミドなどが用いられる。これらによる活性化にはラセミ化抑制添加剤（例えば、HOBt, HOObt）とともに保護アミノ酸を直接樹脂に添加するかまたは、対称酸無水物またはHOBtエステルあるいはHOObtエステルとしてあらかじめ保護アミノ酸の活性化を行なった後に樹脂に添加することができる。

保護アミノ酸の活性化や樹脂との縮合に用いられる溶媒としては、タンパク質縮合反応に使用しうることが知られている溶媒から適宜選択されうる。例えば、N, N-ジメチルホルムアミド、N, N-ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドンなどの酸アミド類、塩化メチレン、クロロホルムなどのハロゲン化炭化水素類、トリフルオロエタノールなどのアルコール類、ジメチルスルホキシドなどのスルホキシド類、ピリジン、ジオキサン、テトラヒドロフランなどのエーテル類、アセトニトリル、プロピオニトリルなどのニトリル類、酢酸メチル、酢酸エチルなどのエステル類あるいはこれらの適宜の混合物などが用いられる。反応温度はタンパク質結合形成反応に使用され得ることが知られている範囲から適宜選択され、通常約-20℃～50℃の範囲から適宜選択される。活性化されたアミノ酸誘導体は通常1.5～4倍過剰で用いられる。ニンヒドリン反応を用いたテストの結果、縮合が不十分な場合には保護基の脱離を行なうことなく縮合反応を繰り返すことにより十分な縮合を行なうことができる。反応を繰り返しても十分な縮合が得られないときには、無水酢酸また

はアセチルイミダゾールを用いて未反応アミノ酸をアセチル化することによって、後の反応に影響を与えないようにすることができる。

原料のアミノ基の保護基としては、例えば、Z、Boc、t-ペンチルオキシカルボニル、イソボルニルオキシカルボニル、4-メトキシベンジルオキシカルボニル、Cl-Z、Br-Z、アダマンチルオキシカルボニル、トリフルオロアセチル、フタロイル、ホルミル、2-ニトロフェニルスルフェニル、ジフェニルホスフィノチオイル、Fmocなどが用いられる。

カルボキシル基は、例えば、アルキルエステル化（例えば、メチル、エチル、プロピル、ブチル、t-ブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクチル、2-アダマンチルなどの直鎖状、分枝状もしくは環状アルキルエステル化）、アラルキルエステル化（例えば、ベンジルエステル、4-ニトロベンジルエステル、4-メトキシベンジルエステル、4-クロロベンジルエステル、ベンズヒドリルエステル化）、フェナシルエステル化、ベンジルオキシカルボニルヒドラジド化、t-ブトキシカルボニルヒドラジド化、トリチルヒドラジド化などによって保護することができる。

セリンの水酸基は、例えば、エステル化またはエーテル化によって保護することができる。このエステル化に適する基としては、例えば、アセチル基などの低級（C₁₋₆）アルカノイル基、ベンゾイル基などのアロイル基、ベンジルオキシカルボニル基、エトキシカルボニル基などの炭酸から誘導される基などが用いられる。また、エーテル化に適する基としては、例えば、ベンジル基、テトラヒドロピラニル基、t-ブチル基などである。

チロシンのフェノール性水酸基の保護基としては、例えば、Bzl、Cl₂-Bzl、2-ニトロベンジル、Br-Z、t-ブチルなどが用いられる。

ヒスチジンのイミダゾールの保護基としては、例えば、Tos、4-メトキシ-2, 3, 6-トリメチルベンゼンスルホニル、DNP、ベンジルオキシメチル、Bum、Boc、Trt、Fmocなどが用いられる。

原料のカルボキシル基の活性化されたものとしては、例えば、対応する酸無水物、アジド、活性エステル〔アルコール（例えば、ペンタクロロフェノール、2, 4, 5-トリクロロフェノール、2, 4-ジニトロフェノール、シアノメチルアルコール、パラニトロフェノール、HONB、N-ヒドロキシスクシミ

ド、N-ヒドロキシフタルイミド、HOBt) とのエステル] などが用いられる。原料のアミノ基の活性化されたものとしては、例えば、対応するリン酸アミドが用いられる。

5 保護基の除去(脱離)方法としては、例えば、Pd-黒あるいはPd-炭素などの触媒の存在下での水素気流中での接触還元や、また、無水フッ化水素、メタンスルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸あるいはこれらの混合液などによる酸処理や、ジイソプロピルエチルアミン、トリエチルアミン、ピペリジン、ピペラジンなどによる塩基処理、また液体アンモニア中ナトリウムによる還元なども用いられる。上記酸処理による脱離反応は、
10 一般に約-20℃~40℃の温度で行なわれるが、酸処理においては、例えば、アニソール、フェノール、チオアニソール、メタクレゾール、パラクレゾール、ジメチルスルフィド、1,4-ブタンジチオール、1,2-エタンジチオールなどのようなカチオン捕捉剤の添加が有効である。また、ヒスチジンのイミダゾール保護基として用いられる2,4-ジニトロフェニル基はチオフェノール
15 処理により除去され、トリプトファンのインドール保護基として用いられるホルミル基は上記の1,2-エタンジチオール、1,4-ブタンジチオールなどの存在下の酸処理による脱保護以外に、希水酸化ナトリウム溶液、希アンモニアなどによるアルカリ処理によっても除去される。

原料の反応に関与すべきでない官能基の保護ならびに保護基、およびその保護基の脱離、反応に関与する官能基の活性化などは公知の基または公知の手段
20 から適宜選択しうる。

タンパク質のアミド体を得る別の方法としては、例えば、まず、カルボキシ末端アミノ酸の α -カルボキシル基をアミド化して保護した後、アミノ基側にペプチド(タンパク質)鎖を所望の鎖長まで延ばした後、該ペプチド鎖のN末端の α -アミノ基の保護基のみを除いたタンパク質とC末端のカルボキシル
25 基の保護基のみを除去したタンパク質とを製造し、この両タンパク質を上記したような混合溶媒中で縮合させる。縮合反応の詳細については上記と同様である。縮合により得られた保護タンパク質を精製した後、上記方法によりすべての保護基を除去し、所望の粗タンパク質を得ることができる。この粗タンパク
30 質は既知の各種精製手段を駆使して精製し、主要画分を凍結乾燥することで所

望のタンパク質のアミド体を得ることができる。

タンパク質のエステル体を得るには、例えば、カルボキシ末端アミノ酸の α -カルボキシル基を所望のアルコール類と縮合しアミノ酸エステルとした後、タンパク質のアミド体と同様にして、所望のタンパク質のエステル体を得ることができる。

本発明の部分ペプチドまたはその塩は、自体公知のペプチドの合成法に従って、あるいは本発明のタンパク質を適当なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。ペプチドの合成法としては、例えば、固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。すなわち、本発明の部分ペプチドを構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離としては、例えば、以下の①～⑤に記載された方法が挙げられる。

①M. Bodanszky および M. A. Ondetti、ペプチド・シンセシス (Peptide Synthesis), Interscience Publishers, New York (1966年)

②SchroederおよびLuebke、ザ・ペプチド (The Peptide), Academic Press, New York (1965年)

③泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株) (1975年)

④矢島治明 および榊原俊平、生化学実験講座 1、タンパク質の化学IV、205、(1977年)

⑤矢島治明監修、続医薬品の開発、第14巻、ペプチド合成、広川書店

また、反応後は通常の前製法、例えば、溶媒抽出、蒸留、カラムクロマトグラフィー、液体クロマトグラフィー、再結晶などを組み合わせて本発明の部分ペプチドを精製単離することができる。上記方法で得られる部分ペプチドが遊離体である場合は、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって適当な塩に変換することができるし、逆に塩で得られた場合は、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって遊離体または他の塩に変換することができる。

本発明のタンパク質をコードするDNAとしては、前述した本発明のタンパク質をコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムDNA、前記した細胞・組織由来のcDNA、合成DNA

のいずれでもよい。

ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、前記した細胞・組織よりtotal RNAまたはmRNA画分を調製したものをを用いて直接Reverse
5 Transcriptase Polymerase Chain Reaction（以下、RT-PCR法と略称する）によって増幅することもできる。

本発明のタンパク質をコードするDNAとしては、例えば、配列番号：4で表わされる塩基配列を含有するDNA、または配列番号：4で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、
10 本発明のタンパク質と実質的に同質の性質（例、血管新生抑制作用など）を有するタンパク質をコードするDNAであれば何れのものでもよい。

配列番号：4で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：4で表わされる塩基配列と約60%以上、好ましくは約70%以上、さらに好ましくは約80%以上の
15 の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

ハイブリダイゼーションは、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えば、モレキュラー・クローニング（Molecular Cloning）2nd（J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989）に記載の方法などに従って
20 行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。より好ましくは、ハイストリンジェントな条件に従って行なうことができる。

ハイストリンジェントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が約19～40 mM、好ましくは約19～20 mMで、温度が約50～70℃、好ましくは約60～65℃の条件を示す。

より具体的には、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするDNAとしては、配列番号：4で表わされる塩基配列を有するDNAなどが用いられる。
25

本発明の部分ペプチドをコードするDNAとしては、前述した本発明の部分ペプチドをコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであ
30 てもよい。また、ゲノムDNA、前記した細胞・組織由来のcDNA、合成D

NAのいずれでもよい。

本発明の部分ペプチドをコードするDNAとしては、例えば、①配列番号：5で表わされる塩基配列を有するDNA、または配列番号：5で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、本発明のタンパク質と実質的に同質の性質を有するタンパク質をコードするDNAの部分塩基配列を有するDNA、②配列番号：6で表わされる塩基配列を有するDNA、または配列番号：6で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、本発明のタンパク質と実質的に同質の性質を有するタンパク質をコードするDNAの部分塩基配列を有するDNAなどが用いられる。

配列番号：5または配列番号：6で表わされる塩基配列とハイブリダイズできるDNAは、前記と同意義を示す。

ハイブリダイゼーションの方法およびハイストリンジェントな条件は前記と同様のものが用いられる。

具体的には、配列番号：2で表わされるアミノ酸配列を有する部分ペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：5で表わされる塩基配列を有するDNAなどが、配列番号：3で表わされるアミノ酸配列を有する部分ペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：6で表わされる塩基配列を有するDNAなどが用いられる。

本発明のタンパク質または部分ペプチド（以下、これらをコードするDNAのクローニングおよび発現の説明においては、これらを単に本発明のタンパク質と略記する場合がある）を完全にコードするDNAのクローニングの手段としては、本発明のタンパク質の部分塩基配列を有する合成DNAプライマーを用いてPCR法によって増幅するか、または適当なベクターに組み込んだDNAを本発明のタンパク質の一部あるいは全領域をコードするDNA断片もしくは合成DNAを用いて標識したものとのハイブリダイゼーションによって選別することができる。ハイブリダイゼーションの方法は、例えば、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行なうことができる。

また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に

従って行なうことができる。

DNAの塩基配列の変換は、PCRや公知のキット、例えば、Mut anTM-Super Express（宝酒造（株））、Mut anTM-K（宝酒造（株））などを用いて、ODA-LA PCR法、Gapped duplex法、Kunkel法などの自公知の方法あるいはそれらに準じる方法に従って行なうことができる。

クローン化されたタンパク質をコードするDNAは目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化したり、リンカーを付加したりして使用することができる。該DNAはその5'末端側に翻訳開始コドンとしてのATGを有し、また3'末端側には翻訳終止コドンとしてのTAA、TGAまたはTAGを有していてもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合成DNAアダプターを用いて付加することもできる。

本発明のタンパク質の発現ベクターは、例えば、（イ）本発明のタンパク質をコードするDNAから目的とするDNA断片を切り出し、（ロ）該DNA断片を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。

ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド（例、pBR322、pBR325、pUC12、pUC13）、枯草菌由来のプラスミド（例、pUB110、pTP5、pC194）、酵母由来プラスミド（例、pSH19、pSH15）、 λ ファージなどのバクテリオファージ、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルスなどの動物ウイルスなどの他、pA1-11、pXT1、pRc/CMV、pRc/RSV、pcDNAI/Neoなどが用いられる。

本発明で用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。例えば、動物細胞を宿主として用いる場合は、SR α プロモーター、SV40プロモーター、HIV-LTRプロモーター、CMVプロモーター、HSV-TKプロモーターなどが挙げられる。

これらのうち、CMV（サイトメガロウイルス）プロモーター、SR α プロモーターなどを用いるのが好ましい。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、

t r pプロモーター、l a cプロモーター、r e c Aプロモーター、 λ P Lプロモーター、l p pプロモーター、T 7プロモーターなどが、宿主がバチルス属菌である場合は、S P O 1プロモーター、S P O 2プロモーター、p e n Pプロモーターなど、宿主が酵母である場合は、P H O 5プロモーター、P G Kプロモーター、G A Pプロモーター、A D Hプロモーターなどが好ましい。宿主が昆虫細胞である場合は、ポリヘドリンプロモーター、P 1 0プロモーターなどが好ましい。

発現ベクターには、以上の他に、所望によりエンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、S V 4 0複製オリジン（以下、S V 4 0 o r iと略称する場合がある）などを含有しているものを用いることができる。選択マーカーとしては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素（以下、d h f rと略称する場合がある）遺伝子〔メソトレキセート（M T X）耐性〕、アンピシリン耐性遺伝子（以下、A m p^rと略称する場合がある）、ネオマイシン耐性遺伝子（以下、N e o^rと略称する場合がある、G 4 1 8耐性）等が挙げられる。特に、d h f r遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞を用いてd h f r遺伝子を選択マーカーとして使用する場合、目的遺伝子をチミジンを含まない培地によっても選択できる。

また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列を、本発明のタンパク質のN端末側に付加する。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、P h o A・シグナル配列、O m p A・シグナル配列などが、宿主がバチルス属菌である場合は、 α -アミラーゼ・シグナル配列、サブチリシン・シグナル配列などが、宿主が酵母である場合は、M F α ・シグナル配列、S U C 2・シグナル配列など、宿主が動物細胞である場合には、インシュリン・シグナル配列、 α -インターフェロン・シグナル配列、抗体分子・シグナル配列などがそれぞれ利用できる。

このようにして構築された本発明のタンパク質をコードするDNAを含有するベクターを用いて、形質転換体を製造することができる。

宿主としては、例えば、エシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫細胞、昆虫、動物細胞などが用いられる。

エシェリヒア属菌の具体例としては、例えば、エシェリヒア・コリ（*Escherichia coli*）K 1 2・D H 1〔プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショ

ナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 60巻, 160(1968)], JM103 [ヌクレック・アシズ・リサーチ, (Nucleic Acids Research), 9巻, 309(1981)], JA221 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (Journal of Molecular Biology)], 120巻, 517(1978)], HB101 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー, 41巻, 459(1969)], C600 [ジェネティックス (Genetics), 39巻, 440(1954)] などが用いられる。

バチルス属菌としては、例えば、バチルス・サブチルス (Bacillus subtilis) MI114 [ジーン, 24巻, 255(1983)], 207-21 [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (Journal of Biochemistry), 95巻, 87(1984)] などが用いられる。

酵母としては、例えば、サッカロマイセス セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae) AH22, AH22R⁻, NA87-11A, DKD-5D, 20B-12, シゾサッカロマイセス ポンベ (Schizosaccharomyces pombe) NCYC1913, NCYC2036, ピキア パストリス (Pichia pastoris) KM71などが用いられる。

昆虫細胞としては、例えば、ウイルスがAcNPVの場合は、夜盗蛾の幼虫由来株化細胞 (Spodoptera frugiperda cell; Sf細胞)、Trichoplusia niの中腸由来のMG1細胞、Trichoplusia niの卵由来のHigh FiveTM細胞、Mamestra brassicae由来の細胞またはEstigmena acrea由来の細胞などが用いられる。ウイルスがBmNPVの場合は、蚕由来株化細胞 (Bombyx mori N細胞; BmN細胞) などが用いられる。該Sf細胞としては、例えば、Sf9細胞 (ATCC CRL1711)、Sf21細胞 [以上、Vaughn, J.L. ら、イン・ヴィボ (In Vivo), 13, 213-217, (1977)] などが用いられる。

昆虫としては、例えば、カイコの幼虫などが用いられる [前田ら、ネイチャー (Nature), 315巻, 592(1985)]。

動物細胞としては、例えば、サル細胞COS-7 (COS7)、Vero、チャイニーズハムスター細胞CHO (以下、CHO細胞と略記)、dhfr遺

伝子欠損チャイニーズハムスター細胞CHO（以下、CHO（dhfr⁻）細胞と略記）、マウスL細胞、マウスAtT-20、マウスミエローマ細胞、ラットGH3、ヒトFL細胞などが用いられる。

エシェリヒア属菌を形質転換するには、例えば、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー（Proc. Natl. Acad. Sci. USA）、69巻、2110（1972）やジーン（Gene）、17巻、107（1982）などに記載の方法に従って行なうことができる。

バチルス属菌を形質転換するには、例えば、モレキュラー・アンド・ジェネラル・ジェネティックス（Molecular & General Genetics）、168巻、111（1979）などに記載の方法に従って行なうことができる。

酵母を形質転換するには、例えば、メソッズ・イン・エンザイモロジー（Methods in Enzymology）、194巻、182-187（1991）、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー（Proc. Natl. Acad. Sci. USA）、75巻、1929（1978）などに記載の方法に従って行なうことができる。

昆虫細胞または昆虫を形質転換するには、例えば、バイオ／テクノロジー（Bio/Technology）、6、47-55（1988）などに記載の方法に従って行なうことができる。

動物細胞を形質転換するには、例えば、細胞工学別冊8 新細胞工学実験プロトコル、263-267（1995）（秀潤社発行）、ヴィロロジー（Virology）、52巻、456（1973）に記載の方法に従って行なうことができる。

このようにして、タンパク質をコードするDNAを含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体を得ることができる。

宿主がエシェリヒア属菌、バチルス属菌である形質転換体を培養する際、培養に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源としては、例えば、グルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素源としては、例えば、アンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンスチープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機または

有機物質、無機物としては、例えば、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどが挙げられる。また、酵母エキス、ビタミン類、生長促進因子などを添加してもよい。培地のpHは約5～8が望ましい。

エシェリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えば、グルコース、カザミノ酸を含むM9培地〔ミラー (Miller), ジャーナル・オブ・エクスペリメンツ・イン・モレキュラー・ジェネティックス (Journal of Experiments in Molecular Genetics), 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972〕が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働かせるために、例えば、3β-インドリルアクリル酸のような薬剤を加えることができる。

宿主がエシェリヒア属菌の場合、培養は通常約15～43℃で約3～24時間行ない、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。

宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常約30～40℃で約6～24時間行ない、必要により通気や攪拌を加えることもできる。

宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、バークホルダー (Burkholder) 最小培地〔Bostian, K. L. ら、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 77巻, 4505 (1980)] や0.5%カザミノ酸を含有するSD培地〔Bitter, G. A. ら、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 81巻, 5330 (1984)] が挙げられる。培地のpHは約5～8に調整するのが好ましい。培養は通常約20℃～35℃で約24～72時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

宿主が昆虫細胞または昆虫である形質転換体を培養する際、培地としては、Grace's Insect Medium (Grace, T. C. C., ネイチャー (Nature), 195, 788 (1962)) に非動化した10%ウシ血清等の添加物を適宜加えたものなどが用いられる。培地のpHは約6.2～6.4に調整するのが好ましい。培養は通常約27℃で約3～5日間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、約5～20%の胎児牛血清を含むMEM培地〔サイエンス (Science), 122

巻, 501(1952)], DMEM培地〔ヴィロロジー (Virology), 8巻, 396(1959)], RPMI 1640培地〔ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエーション (The Journal of the American Medical Association) 199巻, 519(1967)], 199培地〔プロシーディング・オブ・ザ・ソサイエティ・フォー・ザ・バイオロジカル・メディスン (Proceeding of the Society for the Biological Medicine), 73巻, 1(1950)] などが用いられる。pHは約6～8であるのが好ましい。培養は通常約30℃～40℃で約15～60時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

10 以上のようにして、形質転換体の細胞内、細胞膜または細胞外に本発明のタンパク質を生成せしめることができる。

上記培養物から本発明のタンパク質を分離精製するには、例えば、下記の方法により行なうことができる。

本発明のタンパク質を培養菌体あるいは細胞から抽出するに際しては、培養後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチームおよび／または凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊したのち、遠心分離やろ過によりタンパク質の粗抽出液を得る方法などが適宜用いられる。緩衝液の中に尿素や塩酸グアニジンなどのタンパク質変性剤や、トリトンX-100TMなどの界面活性剤が含まれていてもよい。培養液中にタンパク質が分泌される場合には、培養終了後、それ自体公知の方法で菌体あるいは細胞と上清とを分離し、上清を集める。

20 このようにして得られた培養上清、あるいは抽出液中に含まれるタンパク質の精製は、自体公知の分離・精製法を適切に組み合わせて行なうことができる。これらの公知の分離、精製法としては、塩析や溶媒沈澱法などの溶解度を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、およびSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法などの等電点の差を利用する方法などが用いられる。

30 かくして得られるタンパク質が遊離体で得られた場合には、自体公知の方法

あるいはそれに準じる方法によって塩に変換することができ、逆に塩で得られた場合には自体公知の方法あるいはそれに準じる方法により、遊離体または他の塩に変換することができる。

5 なお、組換え体が産生するタンパク質を、精製前または精製後に適当なタンパク修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり、ポリペプチドを部分的に除去することもできる。タンパク修飾酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、アルギニルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グリコシダーゼなどが用いられる。

10 かくして生成する本発明のタンパク質またはその塩の存在は、特異抗体を用いたエンザイムイムノアッセイやWestern blottingなどにより測定することができる。

 本発明のタンパク質、部分ペプチドまたはその塩に対する抗体は、本発明のタンパク質、部分ペプチドまたはその塩を認識し得る抗体であれば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体の何れであってもよい。

15 本発明のタンパク質、部分ペプチドまたはその塩（以下、抗体の説明においては、これらを単に本発明のタンパク質と略記する）に対する抗体は、本発明のタンパク質を抗原として用い、自体公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。

 〔モノクローナル抗体の作製〕

20 （a）モノクローナル抗体産生細胞の作製

 本発明のタンパク質は、温血動物に対して投与により抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は通常2～6週毎に1回ずつ、計2～10回程度行
25 われる。用いられる温血動物としては、例えば、サル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ、ニワトリが挙げられるが、マウスおよびラットが好ましく用いられる。

 モノクローナル抗体産生細胞の作製に際しては、抗原で免疫された温血動物、例えばマウスから抗体価の認められた個体を選択し最終免疫の2～5日後に
30 脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を同種または異

種動物の骨髓腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。抗血清中の抗体価の測定は、例えば、後記の標識化タンパク質と抗血清とを反応させたのち、抗体に結合した標識剤の活性を測定することにより行なうことができる。融合操作は既知の方法、例えば、
5 ケーラーとミルスタインの方法〔ネイチャー (Nature)、256、495 (1975)〕に従い実施することができる。融合促進剤としては、例えば、ポリエチレングリコール (PEG) やセンダイウィルスなどが挙げられるが、好ましくはPEGが用いられる。

骨髓腫細胞としては、例えば、NS-1、P3U1、SP2/0、AP-1
10 などの温血動物の骨髓腫細胞が挙げられるが、P3U1が好ましく用いられる。用いられる抗体産生細胞（脾臓細胞）数と骨髓腫細胞数との好ましい比率は1:1~20:1程度であり、PEG（好ましくはPEG1000~PEG6000）が10~80%程度の濃度で添加され、20~40℃、好ましくは30~37℃で1~10分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合
15 を実施できる。

モノクローナル抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用できるが、例えば、タンパク質抗原を直接あるいは担体とともに吸着させた固相（例、マイクロプレート）にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体（細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる）またはブ
20 ロテインAを加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗体またはプロテインAを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素などで標識したタンパク質を加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法などが挙げられる。

モノクローナル抗体の選別は、自体公知あるいはそれに準じる方法に従って
25 行なうことができる。通常HAT（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン）を添加した動物細胞用培地で行なうことができる。選別および育種用培地としては、ハイブリドーマが生育できるものならばどのような培地を用いても良い。例えば、1~20%、好ましくは10~20%の牛胎児血清を含むRPMI 1640培地、1~10%の牛胎児血清を含むGIT培地（和光純薬工
30

業（株））あるいはハイブリドーマ培養用無血清培地（SFM-101、日水製薬（株））などを用いることができる。培養温度は、通常20～40℃、好ましくは約37℃である。培養時間は、通常5日～3週間、好ましくは1週間～2週間である。培養は、通常5%炭酸ガス下で行なうことができる。ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。

（b）モノクローナル抗体の精製

モノクローナル抗体の分離精製は、自体公知の方法、例えば、免疫グロブリンの分離精製法〔例、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換体（例、DEAE）による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法、抗原結合固相あるいはプロテインAあるいはプロテインGなどの活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法〕に従って行なうことができる。

〔ポリクローナル抗体の作製〕

本発明のポリクローナル抗体は、それ自体公知あるいはそれに準じる方法に従って製造することができる。例えば、免疫抗原（タンパク質抗原）自体、あるいはそれとキャリアタンパク質との複合体をつくり、上記のモノクローナル抗体の製造法と同様に温血動物に免疫を行ない、該免疫動物から本発明のタンパク質に対する抗体含有物を採取して、抗体の分離精製を行なうことにより製造することができる。

温血動物を免疫するために用いられる免疫抗原とキャリアタンパク質との複合体に関し、キャリアタンパク質の種類およびキャリアーとハプテンとの混合比は、キャリアーに架橋させて免疫したハプテンに対して抗体が効率良くできれば、どのようなものをどのような比率で架橋させてもよいが、例えば、ウシ血清アルブミンやウシサイログロブリン、ヘモシアニン等を重量比でハプテン1に対し、約0.1～20、好ましくは約1～5の割合でカプルさせる方法が用いられる。

また、ハプテンとキャリアーのカプリングには、種々の縮合剤を用いることができるが、グルタルアルデヒドやカルボジイミド、マレイミド活性エステル、チオール基、ジチオピリジル基を含有する活性エステル試薬等が用いられる。

縮合生成物は、温血動物に対して、抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は、通常約2～6週毎に1回ずつ、計約3～10回程度行なわれる。

- 5 ポリクローナル抗体は、上記の方法で免疫された温血動物の血液、腹水など、好ましくは血液から採取することができる。

- 10 抗血清中のポリクローナル抗体価の測定は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。ポリクローナル抗体の分離精製は、上記のモノクローナル抗体の分離精製と同様の免疫グロブリンの分離精製法に従って行なうことができる。

- 15 本発明のタンパク質または部分ペプチドをコードするDNA（以下、アンチセンスDNAの説明においては、これらのDNAを本発明のDNAと略記する）に相補的な、または実質的に相補的な塩基配列を有するアンチセンスDNAとしては、本発明のDNAに相補的な、または実質的に相補的な塩基配列を有し、該DNAの発現を抑制し得る作用を有するものであれば、いずれのアンチセンスDNAであってもよい。

- 20 本発明のDNAに実質的に相補的な塩基配列とは、例えば、本発明のDNAに相補的な塩基配列（すなわち、本発明のDNAの相補鎖）の全塩基配列あるいは部分塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列などが挙げられる。特に、本発明のDNAの相補鎖の全塩基配列うち、本発明のタンパク質のN末端部位をコードする部分の塩基配列（例えば、開始コドン付近の塩基配列など）の相補鎖と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアンチセンスDNAが好適である。これらのアンチセンスDNAは、公知のDNA合成装置などを用いて製造することができる。

- 25 以下に、本発明のタンパク質、部分ペプチドまたはその塩（以下、本発明のタンパク質と略記する場合がある）、本発明のタンパク質または部分ペプチドをコードするDNA（以下、本発明のDNAと略記する場合がある）、本発明のタンパク質、部分ペプチドまたはその塩に対する抗体（以下、本発明の抗体
- 30

と略記する場合がある）、およびアンチセンスDNAの用途を説明する。

(1) 本発明のタンパク質は、組織特異的に発現しているため、組織マーカーとして使用することができる。すなわち組織の分化、病態、癌の転移などの検出のためのマーカーとして有用である。また、対応するレセプター、結合タンパク質などの分取にも利用できる。さらに、自体公知のハイスループットスクリーニングのためのパネルにして、生物活性を調べるのに利用できる。また、染色体マッピングを行い、遺伝病の研究にも利用できる。

(2) 本発明のタンパク質が関与する各種疾病の治療・予防剤

本発明のタンパク質などは、生体内で細胞制御因子として存在するため、本発明のタンパク質などまたは本発明のDNAなどに異常があったり、欠損している場合あるいは発現量が異常に減少または高進している場合、例えば、骨・軟骨・関節疾患、癌（悪性腫瘍）、前記以外の病的血管新生、胎児発育不全、臓器不全、消化管障害（例、潰瘍性大腸炎、過敏性腸症候群、クローン病）、外分泌障害（例、シェーグレン症候群、膵嚢胞繊維症）などの種々の疾病が発症する。

したがって、本発明のタンパク質および本発明のDNAは、例えば、骨・軟骨・関節疾患、癌（悪性腫瘍）、前記以外の病的血管新生、胎児発育不全、臓器不全、消化管障害（例、潰瘍性大腸炎、過敏性腸症候群、クローン病）、外分泌障害（例、シェーグレン症候群、膵嚢胞繊維症）などの種々の疾病の治療・予防剤などの医薬として使用することができる。

例えば、生体内において本発明のタンパク質などが減少あるいは欠損しているために、細胞における情報伝達が十分に、あるいは正常に発揮されない患者がいる場合に、(イ) 本発明のDNAを該患者に投与し、生体内で本発明のタンパク質を発現させることによって、(ロ) 細胞に本発明のDNAを挿入し、本発明のタンパク質を発現させた後に、該細胞を患者に移植することによって、または(ハ) 本発明のタンパク質を該患者に投与することなどによって、該患者における本発明のタンパク質の役割を十分に、あるいは正常に発揮させることができる。

本発明のDNAを上記の治療・予防剤として使用する場合は、該DNAを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルス

スアソシエーテッドウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って、ヒトまたは温血動物に投与することができる。本発明のDNAは、そのまま、あるいは摂取促進のための補助剤などの生理学的に認められる担体とともに製剤化し、遺伝子銃やハイドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与できる。

本発明のタンパク質を上記の治療・予防剤として使用する場合は、少なくとも90%、好ましくは95%以上、より好ましくは98%以上、さらに好ましくは99%以上に精製されたものを使用するのが好ましい。

さらに本発明のタンパク等は、再生医学の領域で、各種細胞の分化、臓器再生のための補助剤・保護剤として使用することができる。

本発明のタンパク質は、例えば、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、本発明のタンパク質を生理学的に認められる担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な用量が得られるようにするものである。

錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えば、ゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、前記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施に従って処方することができる。

注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウム

ムなど)などが挙げられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール(例えば、エタノールなど)、ポリアルコール(例えば、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなど)、非イオン性界面活性剤(例えば、ポリソルベート 80TM、HCO-50など)などと併用してもよい。油性液としては、例えば、
5 ゴマ油、大豆油などが挙げられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。また、緩衝剤(例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液など)、無痛化剤(例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど)、安定剤(例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど)、保存剤(例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど)、
10 酸化防止剤などと配合してもよい。調製された注射液は、通常、適当なアンプルに充填される。

本発明のDNAが挿入されたベクターも上記と同様に製剤化され、通常、非経口的に使用される。

このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは温血動物(例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、トリ、ヒツジ、
15 ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど)に対して投与することができる。

本発明のタンパク質の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、悪性腫瘍の治療目的で本発明のタンパク質を経口投与する場合、一般的に成人(60kgとして)においては、一日につき該タンパク質を約1mg~1000mg、好ましくは約10~500mg、より好ましくは約10~200mg投与する。非経口的に投与する場合は、該タンパク質の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、悪性腫瘍の治療目的で本発明のタンパク質を注射剤の形で成人(体重60kgとして)
20 に投与する場合、一日につき該タンパク質を約1~1000mg程度、好ましくは約1~200mg程度、より好ましくは約10~100mg程度を患部に注射することにより投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kgあたりに換算した量を投与することができる。

(3) 疾病に対する医薬候補化合物のスクリーニング

30 本発明のタンパク質は生体内(特にヒト胎児骨格筋、腸管など)で細胞制御

因子として存在するため、本発明のタンパク質の機能を促進する化合物またはその塩は、例えば、骨・軟骨・関節疾患、癌（悪性腫瘍）、前記以外の病的血管新生、胎児発育不全、臓器不全、消化管障害などの治療・予防剤などの医薬として使用できる。

5 一方、本発明のタンパク質の機能を阻害する化合物またはその塩は、本発明のタンパク質の産生過剰に起因する疾患の治療・予防剤などの医薬として使用できる。

したがって、本発明のタンパク質は、本発明のタンパク質の機能を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニングのための試薬として有用である。

すなわち、本発明は、本発明のタンパク質、その部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする本発明のタンパク質、その部分ペプチドまたはその塩の機能を促進する化合物もしくはその塩（以下、促進剤と略記する場合がある）、または本発明のタンパク質、その部分ペプチドまたはその塩の機能を阻害する化合物（以下、阻害剤と略記する場合がある）のスクリーニング方法を提供する。

本発明のスクリーニング用キットは、本発明のタンパク質、部分ペプチドまたはその塩を含有するものである。

20 本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などから選ばれた化合物であり、本発明のタンパク質の機能を促進または阻害する化合物である。

25 該化合物の塩としては、前記した本発明のタンパク質の塩と同様のものが用いられる。

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物を上述の治療・予防剤として使用する場合、常套手段に従って実施することができる。例えば、前記した本発明のタンパク質を含有する医薬と同様にして、例えば、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の

薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。

5 このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは温血動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、トリ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど）に対して投与することができる。

 該化合物またはその塩の投与量は、その作用、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、悪性腫瘍治療の目的で本発明のタンパク質の機能を促進する化合物を経口投与する場合、一般的に成人（体重60kgとして）においては、一日につき該化合物を約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、悪性腫瘍治療の目的で本発明のタンパク質の機能を促進する化合物を注射剤の形で通常成人（60kgとして）に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kgあたりに換算した量を投与することができる。

 一方、本発明のタンパク質の機能を阻害する化合物を経口投与する場合、一般的に成人（体重60kgとして）においては、一日につき該化合物を約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、本発明のタンパク質の機能を阻害する化合物を注射剤の形で通常成人（60kgとして）に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kgあたりに換算した量を投与することができる。

（3）本発明のタンパク質、その部分ペプチドまたはその塩の定量

 本発明のタンパク質に対する抗体（以下、本発明の抗体と略記する場合がある）は、本発明のタンパク質を特異的に認識することができるので、被検液中

の本発明のタンパク質定量、特にサンドイッチ免疫測定法による定量などに使用することができる。

すなわち、本発明は、

(i) 本発明の抗体と、被検液および標識化された本発明のタンパク質とを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化された本発明のタンパク質の割合を測定することを特徴とする被検液中の本発明のタンパク質の定量法、および

(ii) 被検液と担体上に不溶化した本発明の抗体および標識化された本発明の別の抗体とを同時あるいは連続的に反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中の本発明のタンパク質の定量法を提供する。

また、本発明のタンパク質に対するモノクローナル抗体（以下、本発明のモノクローナル抗体と称する場合がある）を用いて本発明のタンパク質の定量を行なえるほか、組織染色等による検出を行なうこともできる。これらの目的には、抗体分子そのものを用いてもよく、また、抗体分子の $F(a b')_2$ 、 $F a b'$ 、あるいは $F a b$ 画分を用いてもよい。

本発明の抗体を用いる本発明のタンパク質の定量法は、特に制限されるべきものではなく、被測定液中の抗原量（例えば、タンパク質量）に対応した抗体、抗原もしくは抗体-抗原複合体の量を化学的または物理的手段により検出し、これを既知量の抗原を含む標準液を用いて作製した標準曲線より算出する測定法であれば、いずれの測定法を用いてもよい。例えば、ネフロメトリー、競合法、イムノメトリック法およびサンドイッチ法が好適に用いられるが、感度、特異性の点で、後述するサンドイッチ法を用いるのが特に好ましい。

標識物質を用いる測定法に用いられる標識剤としては、例えば、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質などが用いられる。放射性同位元素としては、例えば、 $[^{125}I]$ 、 $[^{131}I]$ 、 $[^3H]$ 、 $[^{14}C]$ などが用いられる。上記酵素としては、安定で比活性の大きなものが好ましく、例えば、 β -ガラクトシダーゼ、 β -グルコシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素などが用いられる。蛍光物質としては、例えば、フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネートなどが用いられる。発光物質としては、例えば、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲ

ニンなどが用いられる。さらに、抗体あるいは抗原と標識剤との結合にビオチン-アビジン系を用いることもできる。

5 抗原あるいは抗体の不溶化に当っては、物理吸着を用いてもよく、また通常タンパク質あるいは酵素等を不溶化、固定化するのに用いられる化学結合を用いる方法でもよい。担体としては、アガロース、デキストラン、セルロースなどの不溶性多糖類、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、シリコン等の合成樹脂、あるいはガラス等が挙げられる。

10 サンドイッチ法においては不溶化した本発明のモノクローナル抗体に被検液を反応させ（１次反応）、さらに標識化した別の本発明のモノクローナル抗体を反応させ（２次反応）たのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することにより被検液中の本発明のタンパク質量を定量することができる。１次反応と２次反応は逆の順序に行っても、また、同時に行なってもよいし時間をずらして行なってもよい。標識化剤および不溶化の方法は前記のそれらに準じることができる。また、サンドイッチ法による免疫測定法において、固相用抗体あるいは標識用抗体に用いられる抗体は必ずしも１種類である必要はなく、測定感度を向上させる等の目的で２種類以上の抗体の混合物を用いてもよい。

20 本発明のサンドイッチ法による本発明のタンパク質の測定法においては、１次反応と２次反応に用いられる本発明のモノクローナル抗体は、本発明のタンパク質の結合する部位が相異なる抗体が好ましく用いられる。すなわち、１次反応および２次反応に用いられる抗体は、例えば、２次反応で用いられる抗体が、本発明のタンパク質のＣ端部を認識する場合、１次反応で用いられる抗体は、好ましくはＣ端部以外、例えばＮ端部を認識する抗体が用いられる。

25 本発明のモノクローナル抗体をサンドイッチ法以外の測定システム、例えば、競合法、イムノメトリック法あるいはネフロメトリーなどに用いることができる。

30 競合法では、被検液中の抗原と標識抗原とを抗体に対して競合的に反応させたのち、未反応の標識抗原（Ｆ）と、抗体と結合した標識抗原（Ｂ）とを分離し（Ｂ／Ｆ分離）、Ｂ、Ｆいずれかの標識量を測定し、被検液中の抗原量を定量する。本反応法には、抗体として可溶性抗体を用い、Ｂ／Ｆ分離をポリエチレングリコール、前記抗体に対する第２抗体などを用いる液相法、および、第

1 抗体として固相化抗体を用いるか、あるいは、第1抗体は可溶性のものを用い第2抗体として固相化抗体を用いる固相化法とが用いられる。

イムノメトリック法では、被検液中の抗原と固相化抗原とを一定量の標識化抗体に対して競合反応させた後固相と液相を分離するか、あるいは、被検液中の抗原と過剰量の標識化抗体とを反応させ、次に固相化抗原を加え未反応の標識化抗体を固相に結合させたのち、固相と液相を分離する。次に、いずれかの相の標識量を測定し被検液中の抗原量を定量する。

また、ネフロメトリーでは、ゲル内あるいは溶液中で抗原抗体反応の結果生じた不溶性の沈降物の量を測定する。被検液中の抗原量が僅かであり、少量の沈降物しか得られない場合にもレーザーの散乱を利用するレーザーネフロメトリーなどが好適に用いられる。

これら個々の免疫学的測定法を本発明の定量方法に適用するにあたっては、特別の条件、操作等の設定は必要とされない。それぞれの方法における通常の条件、操作法に当業者の通常の技術的配慮を加えて本発明のタンパク質の測定系を構築すればよい。これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参照することができる。

例えば、入江 寛編「ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和49年発行)、入江 寛編「続ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和54年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(医学書院、昭和53年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第2版)(医学書院、昭和57年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第3版)(医学書院、昭和62年発行)、「Methods in ENZYMOLOGY」Vol. 70(Immunochemical Techniques(Part A))、同書 Vol. 73(Immunochemical Techniques(Part B))、同書 Vol. 74(Immunochemical Techniques(Part C))、同書 Vol. 84(Immunochemical Techniques(Part D:Selected Immunoassays))、同書 Vol. 92(Immunochemical Techniques(Part E:Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods))、同書 Vol. 121(Immunochemical Techniques(Part I:Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies)) (以上、アカデミックプレス社発行)などを参照することができる。

以上のようにして、本発明の抗体を用いることによって、本発明のタンパク質を感度良く定量することができる。

さらには、本発明の抗体を用いて本発明のタンパク質の濃度を定量することによって、本発明のタンパク質の濃度の減少が検出された場合、例えば、骨・軟骨・関節疾患、癌（悪性腫瘍）、前記以外の病的血管新生、臓器不全、消化管障害、外分泌障害などの疾病である、または将来罹患する可能性が高いと診断することができる。

また、本発明の抗体は、体液や組織などの被検体中に存在する本発明のタンパク質を検出するために使用することができる。また、本発明のタンパク質を精製するために使用する抗体カラムの作製、精製時の各分画中の本発明のタンパク質の検出、被検細胞内における本発明のタンパク質の挙動の分析などのために使用することができる。

（５）遺伝子診断剤

本発明のDNAは、例えば、プローブとして使用することにより、ヒトまたは温血動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、トリ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど）における本発明のタンパク質またはその部分ペプチドをコードするDNAまたはmRNAの異常（遺伝子異常）を検出することができるので、例えば、該DNAまたはmRNAの損傷、突然変異あるいは発現低下や、該DNAまたはmRNAの増加あるいは発現過多などの遺伝子診断剤として有用である。

本発明のDNAを用いる上記の遺伝子診断は、例えば、自体公知のノーザンハイブリダイゼーションやPCR-SSCP法（ゲノミクス（Genomics），第5巻，874～879頁（1989年）、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ユーエスエー（Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America），第86巻，2766～2770頁（1989年））、DNAマイクロアレイなどにより実施することができる。

例えば、ノーザンハイブリダイゼーション、DNAマイクロアレイなどにより発現低下が検出された場合やPCR-SSCP法、DNAマイクロアレイなどによりDNAの突然変異が検出された場合は、例えば、骨・軟骨・関節疾患、癌（悪性腫瘍）、前記以外の病的血管新生、胎児発育不全、臓器不全、消化管障害、外分泌障害などの疾病である可能性が高いと診断することができ

る。

(6) アンチセンスDNAを含有する医薬

本発明のDNAに相補的に結合し、該DNAの発現を抑制することができる
アンチセンスDNAは、生体内における本発明のタンパク質または本発明のD
NAの機能を抑制することができるので、例えば、本発明のタンパク質などの
5 発現過多に起因する疾患の治療・予防剤として安全に使用することができる。

上記アンチセンスDNAを上記の治療・予防剤として使用する場合、前記し
た本発明のDNAを含有する各種疾病の治療・予防剤と同様にして実施するこ
とができる。

10 例えば、該アンチセンスDNAを用いる場合、該アンチセンスDNAを単独
あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルス
アソシエーテッドウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套
手段に従って、ヒトまたは哺乳動物（例、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウ
シ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して経口的または非経口的に投与することが
15 できる。該アンチセンスDNAは、そのまま、あるいは摂取促進のために補
助剤などの生理学的に認められる担体とともに製剤化し、遺伝子銃やハイドロ
ゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与できる。あるいは、エアロゾ
ル化して吸入剤として気管内に投与することもできる。

該アンチセンスDNAの投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどに
20 より差異はあるが、例えば、本発明のアンチセンスDNAを吸入剤として気管
内に局所投与する場合、一般的に成人（体重60kg）においては、一日につ
き該アンチセンスDNAを約0.1～100mg投与する。

さらに、該アンチセンスDNAは、組織や細胞における本発明のDNAの存
在やその発現状況を調べるための診断用オリゴヌクレオチドプローブとして
25 使用することもできる。

(7) 本発明の抗体を含有する医薬

本発明のタンパク質の活性を中和する作用を有する本発明の抗体は、例えば、
本発明のタンパク質などの発現過多に起因する疾患の治療・予防剤などの医薬
として使用することができる。

30 本発明の抗体を含有する上記疾患の治療・予防剤は、安全で低毒性のため、

そのまま液剤として、または適当な剤型の医薬組成物として、ヒトまたは哺乳動物（例、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して経口的または非経口的に投与することができる。投与量は、投与対象、対象疾患、症状、投与ルートなどによっても異なるが、例えば、本発明の抗体を1回量として、通常0.01～20mg/kg体重程度、好ましくは0.1～10mg/kg体重程度、さらに好ましくは0.1～5mg/kg体重程度を、1日1～5回程度、好ましくは1日1～3回程度、静脈注射により投与するのが好都合である。他の非経口投与および経口投与の場合もこれに準ずる量を投与することができる。症状が特に重い場合には、その症状に応じて増量してもよい。

本発明の抗体は、それ自体または適当な医薬組成物として投与することができる。上記投与に用いられる医薬組成物は、本発明の抗体と薬理学的に許容され得る担体、希釈剤もしくは賦形剤とを含むものである。かかる組成物は、経口または非経口投与に適する剤形として提供される。

すなわち、例えば、経口投与のための組成物としては、固体または液体の剤形、具体的には錠剤（糖衣錠、フィルムコーティング錠を含む）、丸剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤（ソフトカプセル剤を含む）、シロップ剤、乳剤、懸濁剤などがあげられる。かかる組成物は自体公知の方法によって製造され、製剤分野において通常用いられる担体、希釈剤もしくは賦形剤を含有するものである。例えば、錠剤用の担体、賦形剤としては、乳糖、でんぷん、蔗糖、ステアリン酸マグネシウムなどが用いられる。

非経口投与のための組成物としては、例えば、注射剤、坐剤などが用いられ、注射剤は静脈注射剤、皮下注射剤、皮内注射剤、筋肉注射剤、点滴注射剤などの剤形を包含する。かかる注射剤は、自体公知の方法に従って、例えば、上記抗体またはその塩を通常注射剤に用いられる無菌の水性もしくは油性液に溶解、懸濁または乳化することによって調製する。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例、エタノール）、ポリアルコール（例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン界面活性剤（例、ポリソルベート80、HCO-50 (polyoxyethylene (50 mol) adduct

of hydrogenated castor oil) } などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどを併用してもよい。調製された注射液は、通常、適当なアンプルに充填される。直腸投与に用いられる坐剤は、上記抗体またはその塩を通常の坐薬用基剤に混合することによって調製される。

上記の経口用または非経口用医薬組成物は、活性成分の投与量に適合するような投薬単位の剤形に調製されることが好都合である。かかる投薬単位の剤形としては、錠剤、丸剤、カプセル剤、注射剤（アンプル）、坐剤などが例示され、それぞれの投薬単位剤形当たり通常 5 ～ 500 mg、とりわけ注射剤では 5 ～ 100 mg、その他の剤形では 10 ～ 250 mg の上記抗体が含有されていることが好ましい。

なお前記した各組成物は、上記抗体との配合により好ましくない相互作用を生じない限り他の活性成分を含有してもよい。

(8) DNA 転移動物

本発明は、外来性の本発明のタンパク質をコードする DNA（以下、本発明の外来性 DNA と略記する）またはその変異 DNA（本発明の外来性変異 DNA と略記する場合がある）を有する非ヒト哺乳動物を提供する。

すなわち、本発明は、

- (1) 本発明の外来性 DNA またはその変異 DNA を有する非ヒト哺乳動物、
- (2) 非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である第 (1) 記載の動物、
- (3) ゲッ歯動物がマウスまたはラットである第 (2) 記載の動物、および
- (4) 本発明の外来性 DNA またはその変異 DNA を含有し、哺乳動物において発現しうる組換えベクターを提供するものである。

本発明の外来性 DNA またはその変異 DNA を有する非ヒト哺乳動物（以下、本発明の DNA 転移動物と略記する）は、未受精卵、受精卵、精子およびその始原細胞を含む胚芽細胞などに対して、好ましくは、非ヒト哺乳動物の発生における胚発生の段階（さらに好ましくは、単細胞または受精卵細胞の段階でかつ一般に 8 細胞期以前）に、リン酸カルシウム法、電気パルス法、リポフェクション法、凝集法、マイクロインジェクション法、パーティクルガン法、DEAE-デキストラン法などにより目的とする DNA を転移することによって

作出することができる。また、該DNA転移方法により、体細胞、生体の臓器、組織細胞などに目的とする本発明の外来性DNAを転移し、細胞培養、組織培養などに利用することもでき、さらに、これら細胞を上述の胚芽細胞と自体公知の細胞融合法により融合させることにより本発明のDNA転移動物を作成することもできる。

非ヒト哺乳動物としては、例えば、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、マウス、ラットなどが用いられる。なかでも、病体動物モデル系の作成の面から個体発生および生物サイクルが比較的短く、また、繁殖が容易なゲッ歯動物、とりわけマウス（例えば、純系として、C57BL/6系統、DBA2系統など、交雑系として、B6C3F₁系統、BDF₁系統、B6D2F₁系統、BALB/c系統、ICR系統など）またはラット（例えば、Wistar、SDなど）などが好ましい。

哺乳動物において発現しうる組換えベクターにおける「哺乳動物」としては、上記の非ヒト哺乳動物の他にヒトなどが挙げられる。

本発明の外来性DNAとは、非ヒト哺乳動物が本来有している本発明のDNAではなく、いったん哺乳動物から単離・抽出された本発明のDNAをいう。

本発明の変異DNAとしては、元の本発明のDNAの塩基配列に変異（例えば、突然変異など）が生じたもの、具体的には、塩基の付加、欠損、他の塩基への置換などが生じたDNAなどが用いられ、また、異常DNAも含まれる。

該異常DNAとしては、異常な本発明のタンパク質を発現させるDNAを意味し、例えば、正常な本発明のタンパク質の機能を抑制するタンパク質を発現させるDNAなどが用いられる。

本発明の外来性DNAは、対象とする動物と同種あるいは異種のどちらの哺乳動物由来のものであってもよい。本発明のDNAを対象動物に転移させるにあたっては、該DNAを動物細胞で発現させうるプロモーターの下流に結合したDNAコンストラクトとして用いるのが一般に有利である。例えば、本発明のヒトDNAを転移させる場合、これと相同性が高い本発明のDNAを有する各種哺乳動物（例えば、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由来のDNAを発現させうる各種プロモーターの下流に、本発明のヒトDNAを結合したDNAコンストラクト（例、ベクターなど）を対

象哺乳動物の受精卵、例えば、マウス受精卵へマイクロインジェクションすることによって本発明のDNAを高発現するDNA転移哺乳動物を作出することができる。

本発明のタンパク質の発現ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミド、酵母由来のプラスミド、 λ ファージなどのバクテリオファージ、モロニー白血病ウイルスなどのレトロウイルス、ワクシニアウイルスまたはバキュロウイルスなどの動物ウイルスなどが用いられる。なかでも、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミドまたは酵母由来のプラスミドなどが好ましく用いられる。

上記のDNA発現調節を行なうプロモーターとしては、例えば、①ウイルス（例、シミアンウイルス、サイトメガロウイルス、モロニー白血病ウイルス、JCウイルス、乳癌ウイルス、ポリオウイルスなど）に由来するDNAのプロモーター、②各種哺乳動物（ヒト、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由来のプロモーター、例えば、アルブミン、インスリンII、ウロプラキンII、エラスターゼ、エリスロポエチン、エンドセリン、筋クレアチンキナーゼ、グリア線維性酸性タンパク質 κ 、グルタチオンS-トランスフェラーゼ、血小板由来成長因子 β 、ケラチンK1、K10およびK14、コラーゲンI型およびII型、サイクリックAMP依存タンパク質キナーゼ β Iサブユニット、ジストロフィン、酒石酸抵抗性アルカリフォスファターゼ、心房ナトリウム利尿性因子、内皮レセプターチロシンキナーゼ（一般にTie2と略される）、ナトリウムカリウムアデノシン3リン酸化酵素（Na, K-ATPase）、ニューロフィラメント軽鎖、メタロチオネインIおよびIIA、メタロプロティナーゼ1組織インヒビター、MHCクラスI抗原（H-2L）、H-ras、レニン、ドーパミン β -水酸化酵素、甲状腺ペルオキシダーゼ（TPO）、ポリペプチド鎖延長因子1 α （EF-1 α ）、 β アクチン、 α および β ミオシン重鎖、ミオシン軽鎖1および2、ミエリン基礎タンパク質、チログロブリン、Thy-1、免疫グロブリン、H鎖可変部（VNP）、血清アミロイドPコンポーネント、ミオグロビン、トロポニンC、平滑筋 α アクチン、プレプロエンケファリンA、バソプレシンなどのプロモーターなどが用いられる。なかでも、全身で高発現することが可能なサイトメガロウ

イルスプロモーター、ヒトポリペプチド鎖延長因子 1 α (EF-1 α) のプロモーター、ヒトおよびニワトリ β アクチンプロモーターなどが好適である。

上記ベクターは、DNA転移哺乳動物において目的とするメッセンジャーRNAの転写を終結する配列（一般にターミネターと呼ばれる）を有していることが好ましく、例えば、ウィルス由来および各種哺乳動物由来の各DNAの配列を用いることができ、好ましくは、シミアンウィルスのSV40ターミネターなどが用いられる。

その他、目的とする外来性DNAをさらに高発現させる目的で各DNAのプライミングシグナル、エンハンサー領域、真核DNAのイントロンの一部などをプロモーター領域の5'上流、プロモーター領域と翻訳領域間あるいは翻訳領域の3'下流に連結することも目的により可能である。

該翻訳領域は転移動物において発現しうるDNAコンストラクトとして、前記のプロモーターの下流および所望により転写終結部位の上流に連結させる通常のDNA工学的手法により作製することができる。

受精卵細胞段階における本発明の外来性DNAの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞のすべてに存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において、本発明の外来性DNAが存在することは、作出動物の後代がすべて、その胚芽細胞および体細胞のすべてに本発明の外来性DNAを保持することを意味する。本発明の外来性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞のすべてに本発明の外来性DNAを有する。

本発明の外来性正常DNAを転移させた非ヒト哺乳動物は、交配により外来性DNAを安定に保持することを確認して、該DNA保有動物として通常の飼育環境で継代飼育することが出来る。

受精卵細胞段階における本発明の外来性DNAの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞の全てに過剰に存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において本発明の外来性DNAが過剰に存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の外来性DNAを過剰に有することを意味する。本発明の外来性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の外来性DNA

Aを過剰に有する。

導入DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを過剰に有するように繁殖継代することができる。

- 5 本発明の正常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、本発明の正常DNAが高発現させられており、内在性の正常DNAの機能を促進することにより最終的に本発明のタンパク質の機能亢進症を発症することがあり、その病態モデル動物として利用することができる。例えば、本発明の正常DNA転移動物を用いて、本発明のタンパク質の機能亢進症や、本発明のタンパク質に関連する疾患の病態機序の解明およびこれらの疾患の治療方法の検討を行なうことが可能である。
- 10 る。

また、本発明の外来性正常DNAを転移させた哺乳動物は、遊離した本発明のタンパク質の増加症状を有することから、本発明のタンパク質に関連する疾患に対する治療薬のスクリーニング試験にも利用可能である。

- 15 一方、本発明の外来性異常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、交配により外来性DNAを安定に保持することを確認して該DNA保有動物として通常の飼育環境で継代飼育することが出来る。さらに、目的とする外来DNAを前述のプラスミドに組み込んで原料として用いることができる。プロモーターとのDNAコンストラクトは、通常のDNA工学的手法によって作製することができる。受精卵細胞段階における本発明の異常DNAの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞の全てに存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において本発明の異常DNAが存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の異常DNAを有することを意味する。本発明の外来性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫は、
- 20 その胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の異常DNAを有する。導入DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを有するように繁殖継代することができる。
- 25

- 30 本発明の異常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、本発明の異常DNAが高発現させられており、内在性の正常DNAの機能を阻害することにより最終的に

本発明のタンパク質の機能不活性型不応症となることがあり、その病態モデル動物として利用することができる。例えば、本発明の異常DNA転移動物を用いて、本発明のタンパク質の機能不活性型不応症の病態機序の解明およびこの疾患を治療方法の検討を行なうことが可能である。

- 5 また、具体的な利用可能性としては、本発明の異常DNA高発現動物は、本発明のタンパク質の機能不活性型不応症における本発明の異常タンパク質による正常タンパク質の機能阻害（dominant negative作用）を解明するモデルとなる。

- 10 また、本発明の外来異常DNAを転移させた哺乳動物は、遊離した本発明のタンパク質の増加症状を有することから、本発明のタンパク質の機能不活性型不応症に対する治療薬スクリーニング試験にも利用可能である。

また、上記2種類の本発明のDNA転移動物のその他の利用可能性として、例えば、

- ①組織培養のための細胞源としての使用、
15 ②本発明のDNA転移動物の組織中のDNAもしくはRNAを直接分析するか、またはDNAにより発現されたタンパク質組織を分析することによる、本発明のタンパク質により特異的に発現あるいは活性化するタンパク質との関連性についての解析、
③DNAを有する組織の細胞を標準組織培養技術により培養し、これらを使用して、一般に培養困難な組織からの細胞の機能の研究、
20 ④上記③記載の細胞を用いることによる細胞の機能を高めるような薬剤のスクリーニング、および
⑤本発明の変異タンパク質を単離精製およびその抗体作製などが考えられる。

- さらに、本発明のDNA転移動物を用いて、本発明のタンパク質の機能不活
25 性型不応症などを含む、本発明のタンパク質に関連する疾患の臨床症状を調べることができ、また、本発明のタンパク質に関連する疾患モデルの各臓器におけるより詳細な病理学的所見が得られ、新しい治療方法の開発、さらには、該疾患による二次的疾患の研究および治療に貢献することができる。

- 30 また、本発明のDNA転移動物から各臓器を取り出し、細切後、トリプシンなどのタンパク質分解酵素により、遊離したDNA転移細胞の取得、その培養

またはその培養細胞の系統化を行なうことが可能である。さらに、本発明のタンパク質産生細胞の特定化、アポトーシス、分化あるいは増殖との関連性、またはそれらにおけるシグナル伝達機構を調べ、それらの異常を調べることなどができ、本発明のタンパク質およびその作用解明のための有効な研究材料となる。

さらに、本発明のDNA転移動物を用いて、本発明のタンパク質の機能不活性型不応症を含む、本発明のタンパク質に関連する疾患の治療薬の開発を行なうために、上述の検査法および定量法などを用いて、有効で迅速な該疾患治療薬のスクリーニング法を提供することが可能となる。また、本発明のDNA転移動物または本発明の外来性DNA発現ベクターを用いて、本発明のタンパク質が関連する疾患のDNA治療法を検討、開発することが可能である。

(9) ノックアウト動物

本発明は、本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞および本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を提供する。

すなわち、本発明は、

- (1) 本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞、
- (2) 該DNAがレポーター遺伝子（例、大腸菌由来の β -ガラクトシダーゼ遺伝子）を導入することにより不活性化された第(1)項記載の胚幹細胞、
- (3) ネオマイシン耐性である第(1)項記載の胚幹細胞、
- (4) 非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である第(1)項記載の胚幹細胞、
- (5) ゲッ歯動物がマウスである第(4)項記載の胚幹細胞、
- (6) 本発明のDNAが不活性化された該DNA発現不全非ヒト哺乳動物、
- (7) 該DNAがレポーター遺伝子（例、大腸菌由来の β -ガラクトシダーゼ遺伝子）を導入することにより不活性化され、該レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの制御下で発現しうる第(6)項記載の非ヒト哺乳動物、
- (8) 非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である第(6)項記載の非ヒト哺乳動物、
- (9) ゲッ歯動物がマウスである第(8)項記載の非ヒト哺乳動物、および
- (10) 第(7)項記載の動物に、試験化合物を投与し、レポーター遺伝子の発現を検出することを特徴とする本発明のDNAに対するプロモーター活性

を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞とは、該非ヒト哺乳動物が有する本発明のDNAに人為的に変異を加えることにより、DNAの発現能を抑制するか、もしくは該DNAがコードしている本発明のタンパク質の活性を実質的に喪失させることにより、DNAが実質的に本発明のタンパク質の発現能を有さない（以下、本発明のノックアウトDNAと称することがある）非ヒト哺乳動物の胚幹細胞（以下、ES細胞と略記する）をいう。

非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものが用いられる。

本発明のDNAに人為的に変異を加える方法としては、例えば、遺伝子工学的手法により該DNA配列の一部又は全部の削除、他DNAを挿入または置換させることによって行なうことができる。これらの変異により、例えば、コドンの読み取り枠をずらしたり、プロモーターあるいはエキソンの機能を破壊することにより本発明のノックアウトDNAを作製すればよい。

本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞（以下、本発明のDNA不活性化ES細胞または本発明のノックアウトES細胞と略記する）の具体例としては、例えば、目的とする非ヒト哺乳動物が有する本発明のDNAを単離し、そのエキソン部分にネオマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子を代表とする薬剤耐性遺伝子、あるいはlacZ（ β -ガラクトシダーゼ遺伝子）、cat（クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子）を代表とするレポーター遺伝子等を挿入することによりエキソンの機能を破壊するか、あるいはエキソン間のイントロン部分に遺伝子の転写を終結させるDNA配列（例えば、polyA付加シグナルなど）を挿入し、完全なメッセンジャーRNAを合成できなくすることによって、結果的に遺伝子を破壊するように構築したDNA配列を有するDNA鎖（以下、ターゲッティングベクターと略記する）を、例えば相同組換え法により該動物の染色体に導入し、得られたES細胞について本発明のDNA上あるいはその近傍のDNA配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析あるいはターゲッティングベクター上のDNA配列とターゲッティングベクター作製に使用した本発明のDNA以外の近傍領域のDNA配列をプライマーとしたPCR法により解析し、本発明のノックアウトES細胞を選別することにより得ることができる。

また、相同組換え法等により本発明のDNAを不活化させる元のES細胞としては、例えば、前述のような既に樹立されたものを用いてもよく、また公知のEvansとKaufmanの方法に準じて新しく樹立したものでもよい。例えば、マウスのES細胞の場合、現在、一般的には129系のES細胞が使用
5 されているが、免疫学的背景がはっきりしていないので、これに代わる純系で免疫学的に遺伝的背景が明らかなES細胞を取得するなどの目的で例えば、C57BL/6マウスやC57BL/6の採卵数の少なさをDBA/2との交雑により改善したBDF₁マウス(C57BL/6とDBA/2とのF₁)を用いて樹立したものなども良好に用いる。BDF₁マウスは、採卵数が多く、
10 かつ、卵が丈夫であるという利点に加えて、C57BL/6マウスを背景に持つので、これを用いて得られたES細胞は病態モデルマウスを作出したとき、C57BL/6マウスとバッククロスすることでその遺伝的背景をC57BL/6マウスに代えることが可能である点で有利に用い得る。

また、ES細胞を樹立する場合、一般には受精後3.5日目の胚盤胞を使用
15 するが、これ以外に8細胞期胚を採卵し胚盤胞まで培養して用いることにより効率よく多数の初期胚を取得することができる。

また、雌雄いずれのES細胞を用いてもよいが、通常雄のES細胞の方が生殖系列キメラを作出するのに都合が良い。また、煩雑な培養の手間を削減するためにもできるだけ早く雌雄の判別を行なうことが望ましい。

ES細胞の雌雄の判定方法としては、例えば、PCR法によりY染色体上の性決定領域の遺伝子を増幅、検出する方法が、その1例として挙げることができる。この方法を使用すれば、従来、核型分析をするのに約10⁶個の細胞数を要していたのに対して、1コロニー程度のES細胞数(約50個)で済むので、培養初期におけるES細胞の第一次セクションを雌雄の判別で行なうこ
20 ことが可能であり、早期に雄細胞の選定を可能にしたことにより培養初期の手間は大幅に削減できる。

また、第二次セクションとしては、例えば、G-バンディング法による染色体数の確認等により行うことができる。得られるES細胞の染色体数は正常数の100%が望ましいが、樹立の際の物理的操作等の関係上困難な場合は、
30 ES細胞の遺伝子をノックアウトした後、正常細胞(例えば、マウスでは染色

体数が $2n=40$ である細胞) に再びクローニングすることが望ましい。

このようにして得られた胚幹細胞株は、通常その増殖性は大変良いが、個体発生できる能力を失いやすいので、注意深く継代培養することが必要である。例えば、STO 繊維芽細胞のような適当なフィーダー細胞上で LIF (1-10000 U/ml) 存在下に炭酸ガス培養器内 (好ましくは、5% 炭酸ガス、95% 空気または 5% 酸素、5% 炭酸ガス、90% 空気) で約 37℃ で培養するなど、の方法で培養し、継代時には、例えば、トリプシン/EDTA 溶液 (通常 0.001-0.5% トリプシン/0.1-5 mM EDTA、好ましくは約 0.1% トリプシン/1 mM EDTA) 処理により単細胞化し、新たに用意したフィーダー細胞上に播種する方法などがとられる。このような継代は、通常 1-3 日毎に行なうが、この際に細胞の観察を行い、形態的に異常な細胞が見受けられた場合はその培養細胞は放棄することが望まれる。

ES 細胞は、適当な条件により、高密度に至るまで単層培養するか、または細胞集塊を形成するまで浮遊培養することにより、頭頂筋、内臓筋、心筋などの種々のタイプの細胞に分化させることが可能であり [M. J. Evans および M. H. Kaufman, ネイチャー (Nature) 第 292 巻、154 頁、1981 年; G. R. Martin プロシーディングス・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.) 第 78 巻、7634 頁、1981 年; T. C. Doetschman ら、ジャーナル・オブ・エンブリオロジー・アンド・エクスペリメンタル・モルフォロジー、第 87 巻、27 頁、1985 年]、本発明の ES 細胞を分化させて得られる本発明の DNA 発現不全細胞は、インビトロにおける本発明のタンパク質の細胞生物学的検討において有用である。

本発明の DNA 発現不全非ヒト哺乳動物は、該動物の mRNA 量を公知方法を用いて測定して間接的にその発現量を比較することにより、正常動物と区別することが可能である。

該非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものが用いられる。

本発明の DNA 発現不全非ヒト哺乳動物は、例えば、前述のようにして作製したターゲッティングベクターをマウス胚幹細胞またはマウス卵細胞に導入し、導入によりターゲッティングベクターの本発明の DNA が不活性化された DNA 配列が遺伝子相同組換えにより、マウス胚幹細胞またはマウス卵細胞の

染色体上の本発明のDNAと入れ換わる相同組換えをさせることにより、本発明のDNAをロックアウトさせることができる。

5 本発明のDNAがロックアウトされた細胞は、本発明のDNA上またはその近傍のDNA配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析またはターゲッティングベクター上のDNA配列と、ターゲッティングベクターに使用したマウス由来の本発明のDNA以外の近傍領域のDNA配列とをプライマーとしたPCR法による解析で判定することができる。非ヒト哺乳動物胚幹細胞を用いた場合は、遺伝子相同組換えにより、本発明のDNAが不活性化された細胞株をクローニングし、その細胞を適当な時期、例えば、8細胞期の
10 非ヒト哺乳動物胚または胚盤胞に注入し、作製したキメラ胚を偽妊娠させた該非ヒト哺乳動物の子宮に移植する。作出された動物は正常な本発明のDNA座をもつ細胞と人為的に変異した本発明のDNA座をもつ細胞との両者から構成されるキメラ動物である。

15 該キメラ動物の生殖細胞の一部が変異した本発明のDNA座をもつ場合、このようなキメラ個体と正常個体を交配することにより得られた個体群より、全ての組織が人為的に変異を加えた本発明のDNA座をもつ細胞で構成された個体を、例えば、コートカラーの判定等により選別することにより得られる。このようにして得られた個体は、通常、本発明のタンパク質のヘテロ発現不全個体であり、本発明のタンパク質のヘテロ発現不全個体同志を交配し、それら
20 の産仔から本発明のタンパク質のホモ発現不全個体を得ることができる。

卵細胞を使用する場合は、例えば、卵細胞核内にマイクロインジェクション法でDNA溶液を注入することによりターゲッティングベクターを染色体内に導入したトランスジェニック非ヒト哺乳動物を得ることができ、これらのトランスジェニック非ヒト哺乳動物に比べて、遺伝子相同組換えにより本発明の
25 DNA座に変異のあるものを選択することにより得られる。

このようにして本発明のDNAがロックアウトされている個体は、交配により得られた動物個体も該DNAがロックアウトされていることを確認して通常の飼育環境で飼育継代を行なうことができる。

さらに、生殖系列の取得および保持についても常法に従えばよい。すなわち、
30 該不活化DNAの保有する雌雄の動物を交配することにより、該不活化DNA

を相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得しうる。得られたホモザイゴート動物は、母親動物に対して、正常個体1、ホモザイゴート複数になるような状態で飼育することにより効率的に得ることができる。ヘテロザイゴート動物の雌雄を交配することにより、該不活化DNAを有するホモザイゴートおよびヘテロザイゴート動物を繁殖継代する。

本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を作出する上で、非常に有用である。

また、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のタンパク質により誘導され得る種々の生物活性を欠失するため、本発明のタンパク質の生物活性の不活性化を原因とする疾病のモデルとなり得るので、これらの疾病の原因究明及び治療法の検討に有用である。

(9a) 本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して治療・予防効果を有する化合物のスクリーニング方法

本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病（例、骨・軟骨・関節疾患、癌（悪性腫瘍）、前記以外の病的血管新生、胎児発育不全、臓器不全、消化管障害、外分泌障害など）に対して治療・予防効果を有する化合物のスクリーニングに用いることができる。

すなわち、本発明は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に試験化合物を投与し、該動物の変化を観察・測定することを特徴とする、本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して治療・予防効果を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

該スクリーニング方法において用いられる本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものが挙げられる。

試験化合物としては、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

具体的には、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を、試験化合物で処理し、無処理の対照動物と比較し、該動物の各器官、組織、疾病の症状などの変化を指標として試験化合物の治療・予防効果を試験することができる。

試験動物を試験化合物で処理する方法としては、例えば、経口投与、静脈注射などが用いられ、試験動物の症状、試験化合物の性質などにあわせて適宜選択す

5 ることができる。また、試験化合物の投与量は、投与方法、試験化合物の性質などにあわせて適宜選択することができる。

本発明のスクリーニング方法を用いて得られる化合物は、上記した試験化合物から選ばれた化合物であり、本発明のタンパク質の欠損や損傷などによって引き起こされる疾患（例、骨・軟骨・関節疾患、癌（悪性腫瘍）、病的血管新生、臓器不全、消化管障害、外分泌障害など）に対して治療・予防効果を有するので、該疾患に対する安全で低毒性な治療・予防剤などの医薬として使用する
10 ことができる。さらに、上記スクリーニングで得られた化合物から誘導される化合物も同様に用いることができる。

該スクリーニング方法で得られた化合物は塩を形成していてもよく、該化合物の塩としては、生理学的に許容される酸（例、無機酸、有機酸）や塩基（例
15 アルカリ金属）などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。

20 該スクリーニング方法で得られた化合物またはその塩を含有する医薬は、前記した本発明のタンパク質を含有する医薬と同様にして製造することができる。

このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは哺乳動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、
25 ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、悪性腫瘍の治療目的で該化合物を経口投与する場合、一般的に成人（体重60kgとして）においては、一日につき該化合物を約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.
30 0～20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は

投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、悪性腫瘍の治療目的で該化合物を注射剤の形で通常成人（60 kgとして）に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01～30 mg程度、好ましくは約0.1～20 mg程度、より好ましくは約0.1～10 mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kgあたりに換算した量を投与することができる。

（9b）本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物をスクリーニング方法

本発明は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に、試験化合物を投与し、レポーター遺伝子の発現を検出することを特徴とする本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

上記スクリーニング方法において、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物としては、前記した本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物の中でも、本発明のDNAがレポーター遺伝子を導入することにより不活性化され、該レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの制御下で発現しうるものが用いられる。

試験化合物としては、前記と同様のものが挙げられる。

レポーター遺伝子としては、前記と同様のものが用いられ、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子（lacZ）、可溶性アルカリフォスファターゼ遺伝子またはルシフェラーゼ遺伝子などが好適である。

本発明のDNAをレポーター遺伝子で置換された本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物では、レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの支配下に存在するので、レポーター遺伝子がコードする物質の発現をトレースすることにより、プロモーターの活性を検出することができる。

例えば、本発明のタンパク質をコードするDNA領域の一部を大腸菌由来の β -ガラクトシダーゼ遺伝子（lacZ）で置換している場合、本来、本発明のタンパク質の発現する組織で、本発明のタンパク質の代わりに β -ガラクトシダーゼが発現する。従って、例えば、5-プロモ-4-クロロ-3-インドリル- β -ガラクトピラノシド（X-gal）のような β -ガラクトシダーゼ

の基質となる試薬を用いて染色することにより、簡便に本発明のタンパク質の動物生体内における発現状態を観察することができる。具体的には、本発明のタンパク質欠損マウスまたはその組織切片をグルタルアルデヒドなどで固定し、リン酸緩衝生理食塩液（PBS）で洗浄後、X-galを含む染色液で、
5 室温または37℃付近で、約30分ないし1時間反応させた後、組織標本を1 mM EDTA/PBS溶液で洗浄することによって、 β -ガラクトシダーゼ反応を停止させ、呈色を観察すればよい。また、常法に従い、lacZをコードするmRNAを検出してもよい。

上記スクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩は、上記した
10 試験化合物から選ばれた化合物であり、本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進または阻害する化合物である。

該スクリーニング方法で得られた化合物は塩を形成していてもよく、該化合物の塩としては、生理学的に許容される酸（例、無機酸）や塩基（例、有機酸）などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。
15 この様な塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。

本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進する化合物またはその塩
20 は、本発明のタンパク質の発現を促進し、該タンパク質の機能を促進することができるので、例えば、骨・軟骨・関節疾患、癌（悪性腫瘍）、前記以外の病的血管新生、臓器不全、消化管障害、外分泌障害などの疾病に対する安全で低毒性な治療・予防剤などの医薬として有用である。

さらに、上記スクリーニングで得られた化合物から誘導される化合物も同様に用いることができる。
25

該スクリーニング方法で得られた化合物またはその塩を含有する医薬は、前記した本発明のタンパク質またはその塩を含有する医薬と同様にして製造することができる。

このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは哺乳動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、
30

ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、悪性腫瘍の治療目的で本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進する化合物を経口投与する場合、一般的に成人（体重60 kgとして）においては、一日につき該化合物を約0.1～100 mg、好ましくは約1.0～50 mg、より好ましくは約1.0～20 mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、悪性腫瘍の治療目的で本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進する化合物を注射剤の形で通常成人（60 kgとして）に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01～30 mg程度、好ましくは約0.1～20 mg程度、より好ましくは約0.1～10 mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kg当りに換算した量を投与することができる。

一方、例えば、本発明のDNAに対するプロモーター活性を阻害する化合物を経口投与する場合、一般的に成人（体重60 kgとして）においては、一日につき該化合物を約0.1～100 mg、好ましくは約1.0～50 mg、より好ましくは約1.0～20 mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、本発明のDNAに対するプロモーター活性を阻害する化合物を注射剤の形で通常成人（60 kgとして）に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01～30 mg程度、好ましくは約0.1～20 mg程度、より好ましくは約0.1～10 mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kg当りに換算した量を投与することができる。

このように、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物またはその塩をスクリーニングする上で極めて有用であり、本発明のDNA発現不全に起因する各種疾患の原因究明または予防・治療薬の開発に大きく貢献することができる。

本明細書および図面において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature による略号

あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。
またアミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければL体を示すものとする。

	DNA	: デオキシリボ核酸
5	cDNA	: 相補的デオキシリボ核酸
	A	: アデニン
	T	: チミン
	G	: グアニン
	C	: シトシン
10	RNA	: リボ核酸
	mRNA	: メッセンジャーリボ核酸
	dATP	: デオキシアデノシン三リン酸
	dTTP	: デオキシチミジン三リン酸
	dGTP	: デオキシグアノシン三リン酸
15	dCTP	: デオキシシチジン三リン酸
	ATP	: アデノシン三リン酸
	EDTA	: エチレンジアミン四酢酸
	SDS	: ドデシル硫酸ナトリウム
	Gly	: グリシン
20	Ala	: アラニン
	Val	: バリン
	Leu	: ロイシン
	Ile	: イソロイシン
	Ser	: セリン
25	Thr	: スレオニン
	Cys	: システイン
	Met	: メチオニン
	Glu	: グルタミン酸
	Asp	: アスパラギン酸
30	Lys	: リジン

	A r g	: アルギニン
	H i s	: ヒスチジン
	P h e	: フェニルアラニン
	T y r	: チロシン
5	T r p	: トリプトファン
	P r o	: プロリン
	A s n	: アスパラギン
	G l n	: グルタミン
	p G l u	: ピログルタミン酸

10

また、本明細書中で繁用される置換基、保護基および試薬を下記の記号で表記する。

	M e	: メチル基
	E t	: エチル基
15	B u	: ブチル基
	P h	: フェニル基
	T C	: チアゾリジン-4 (R) -カルボキサミド基
	T o s	: p-トルエンスルフォニル
	C H O	: ホルミル
20	B z l	: ベンジル
	C l ₂ -B z l	: 2, 6-ジクロロベンジル
	B o m	: ベンジルオキシメチル
	Z	: ベンジルオキシカルボニル
	C l-Z	: 2-クロロベンジルオキシカルボニル
25	B r-Z	: 2-ブロモベンジルオキシカルボニル
	B o c	: t-ブトキシカルボニル
	D N P	: ジニトロフェニル
	T r t	: トリチル
	B u m	: t-ブトキシメチル
30	F m o c	: N-9-フルオレニルメトキシカルボニル

- HOB t : 1-ヒドロキシベンズトリアゾール
- HOOB t : 3, 4-ジヒドロ-3-ヒドロキシ-4-オキソ-
1, 2, 3-ベンゾトリアジン
- HONB : 1-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2, 3-ジカルボキシイミド
- 5 DCC : N, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド

本願明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

〔配列番号：1〕

本発明のタンパク質（ヒトNCHM）のアミノ酸配列を示す。

10 〔配列番号：2〕

配列番号：1で表わされるアミノ酸配列の49番目～317番目のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：3〕

15 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列の215番目～317番目のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：4〕

配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を有する本発明のタンパク質（ヒトNCHM）をコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：5〕

20 配列番号：2で表わされるアミノ酸配列をコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：6〕

配列番号：3で表わされるアミノ酸配列をコードするDNAの塩基配列を示す。

25 〔配列番号：7〕

後述の実施例1で使用したオリゴDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：8〕

後述の実施例1で使用したオリゴDNAの塩基配列を示す。

30 後述の実施例1で得られた形質転換体 *Escherichia coli*

DH5 α /pTBN3は、2000年1月18日から日本国大阪府大阪市淀川区十三本町2-17-85の発酵研究所（IFO）に寄託番号 IFO 16354として、2000年2月2日から日本国茨城県つくば市東1-1-3の通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（NIBH）に寄託番号 FER
5 M BP-7017としてそれぞれ寄託されている。

以下に、実施例を挙げて本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はそれ
に限定されるものではない。なお、大腸菌を用いての遺伝子操作法は、モレキ
ュラー・クローニング（Molecular cloning）に記載されている方法に従った。

10 実施例 1

ヒトNCHMタンパク質をコードするcDNAのクローニング

本発明のヒトNCHMタンパク質をコードするcDNAを、以下のようなP
CR法により取得した。

配列番号：7で表されるオリゴDNA（TCAGCAGTGGTCTCTC
15 AGTCCTCTCA）をセンス鎖プライマーとして、配列番号：8で表され
るオリゴDNA（ACAAGTAATTCTGGAGAGCTGGCTACC
A）をアンチセンス鎖プライマーとして各々50pmol、Premix Taq
TM（Ex TaqTM Version）（宝酒造（株））25 μ l、鋳型DN
Aとしてヒト胎児骨格筋cDNA溶液（クロンテック（株））0.5 μ lを含
20 む混合液50 μ lを調製し、サーマルサイクラー（GeneAmp^R PCR
system model 9700（パーキンエルマー社））を用いて、最初
に94℃で1分間置いた後、94℃で20秒、50℃で30秒、72℃で3分
を1サイクルとして35サイクル繰り返し、さらに72℃で5分間伸長反応さ
せるプログラムでPCR反応を行った。反応終了液を1%アガロースゲルを用
25 いて電気泳動後エチジウムブロマイド染色したところ、分子量マーカー換算で
1.2kb付近の位置にPCR反応で増幅されたDNAに対応するバンドを確認
した。キアquickゲルエキストラクションキット（キアゲン社）を用いて
該DNA断片を回収し、塩基配列を決定する為にpCR^R2.1-TOPO（イ
ンビトロジェン社）を用いてTAクローニングし、該プラスミドを大腸菌DH
30 5 α 株のコンピテントセルに導入した。アンピシリン含有LB寒天培地上で出

現するアンピシリン耐性形質転換株のコロニーの中から外来DNA断片が挿入がされていたプラスミドを保持していたクローンを選択し、該プラスミドDNA、pTBN3を調製した。挿入DNAの塩基配列を決定するため、pTBN3を鋳型DNAとし、ABI PRISM^R BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (パーキンエルマー社)を用いたシーケンス反応を添付資料の条件にしたがって、サーマルサイクラー [GeneAmp^R PCR system model 9700 (パーキンエルマー社)]で行った後、該反応試料をDNAシーケンサーABI PRISM^R 377 (パーキンエルマー社)で分析した。

10 その結果、pTBN3のクローニング部位には、公知のタンパク質とは全く相同性がない配列番号：1で表される317個のアミノ酸からなる新規タンパク質NCHMをコードする配列番号：4で表される951塩基の塩基配列からなるオープンリーディングフレーム (open reading frame) を含む図1の配列を有するDNA断片が挿入されていた (図1では、ベクターDNAのEcoRI認識部位より挿入配列側を示す)。コードされるNCHMタンパク質には、
15 28番目セリン (Ser) から49番目グリシン (Gly) のアミノ酸残基にかけて細胞膜局在タンパク質が有する膜貫通領域に相当する疎水性に富む領域が存在する。

また、公知のタンパク質に相同性の高いものは見あたらず、図2に示すラット
20 コンドロモジュリンI前駆体タンパク質、ヒトコンドロモジュリンI前駆体タンパク質、ウシコンドロモジュリンI前駆体タンパク質、ウサギコンドロモジュリンI前駆体タンパク質との相同性はアミノ酸レベルでそれぞれ39%、37%、37%、35%であった。

こうして得られたプラスミドpTBN3を大腸菌DH5 α に導入し、形質転
25 換体Escherichia coli DH5 α /pTBN3を得た。

実施例2

ヒトNCHM発現部位の解析

実施例1に記載の挿入DNA断片 (pTBN3のEcoRI-EcoRI
30 1.1kb断片) 20ngと [α -³²P] dCTP (Amersham: 60

00Ci/mmol) 5 μ lとを用いて、Multiprime DNA labeling system (Amersham: RPN. 1601Y)の方法でDNAプローブを作製した。このプローブを用いて、ヒトマルチティッシュノーザンブロット (CLONTECH社: #7759-1, #7760-1) およびヒトRNAマスターブロット (CLONTECH社: #7770-1) に対してハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイズおよび洗浄の条件は、添付のマニュアルに従い、検出は、BAS-2000 (フジフィルム) を用いて行った。その結果、実施例1記載のヒト胎児骨格筋以外に、少なくとも大腸、小腸、外分泌腺などを含む特定の組織、臓器で発現していることが明らかとなった。

実施例3

NCHMタンパク質細胞外領域とFLAGエピトープペプチドの融合タンパク質のCOS7細胞での発現とその検出

以下の要領で、NCHMタンパク質細胞外領域とFLAGエピトープペプチドの融合タンパク質のCOS7細胞での発現およびその検出を行う。まず実施例1で得られたNCHMタンパク質をコードするcDNAの塩基配列に基づき、2種のプライマーDNAを化学合成する。一つは、5'-CGAATTC CCACCATGGGGAGCAAGCACTTCTGGCCGGAGGT AC-3' (配列番号: 9) であり、これは制限酵素EcoRI認識部位を含むアンカー配列を5'末端側に持ち、開始コドンと+145~+172 (翻訳開始部位を+1とする) までのセンス配列を含むオリゴDNAである。もう一つは、5'-GTACAGTCGACGACCCTCCCCAGCATGCG GGCCACCCA-3' (配列番号: 10) であり、これは制限酵素SalI認識部位を含むアンカー配列の3'側に+925~+951までのアンチセンス配列がつながった配列を有するオリゴDNAである。実施例1で得られたプラスミドpTBN3を鋳型として、これら2種のプライマーDNAおよびTakara LA Taq (宝酒造) を用い、サーマルサイクラーGeneAmpTM PCR system 9700 (パーキンエルマー社) にて、最初98℃で30秒間置いた後、98℃で10秒、55℃で20秒、72℃で2分を

1 反応サイクルとして25サイクル増幅反応を繰返し、最後に72℃で5分間
伸長反応を行う。得られるDNA断片を精製後、制限酵素EcoRIとSal
Iで末端消化の後再精製し、動物細胞用発現ベクターpCAN618FLAG
のEcoRI、SalI部位へ挿入、連結する。pCAN618FLAGは、
5 プラスミドベクターpCAN618に由来し、選択マーカとしてのネオマイ
シン耐性遺伝子を持つと共に、目的タンパク質をコードするDNA断片をその
クローニング部位であるEcoRI、SalI部位に挿入することでサイトメ
ガロウイルスの極初期遺伝子エンハンサーとその下流の β -アクチンプロモ
ーター制御下で該タンパク質を発現させることができるのみならず、SalI
10 部位直後に存在する8アミノ酸のFLAGエピトープ配列(Asp-Tyr-
Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys)をコードする塩基配列と
終止コドンに読み取り枠を合わせることで該目的タンパク質をFLAG融合
タンパク質として発現させることも可能である。上述のPCRクローニングD
NA断片のpCAN618FLAGへの挿入もNCHMタンパク質細胞外領
15 域とFLAGエピトープの融合タンパク質(間にValを1残基挿む)を発現
する目的で行い、その結果、発現ベクタープラスミドpNCHMtra-Fを
得る。

次にCOS7細胞(1.2×10^5 細胞)を6穴プレートを用いて、10%
牛胎児血清(FBS)を含むダルベッコ変法最小培地(DMEM)で24時間
20 培養し、この細胞に上記の発現プラスミドpNCHMtra-F(1ウェルあ
たり0.4 μ g)をリポフェクトアミン(Gibco BRL)を用いて導
入する。導入24時間後、上記の新しい培地に交換し、さらに5時間後、FBS
不含有Opti-MEM(Gibco BRL)に換えて36時間培養後、
その培養上清と細胞抽出液を得る。細胞抽出液は細胞を生理食塩を含むリン酸
25 緩衝液(PBS)で2回洗浄後、トリスSDSサンプル緩衝液で溶解抽出し、
一方、培養上清は限外濾過(分子量3000カット)で適宜濃縮後、等容の
トリスSDSサンプル緩衝液と混合する。これらのサンプルを熱処理後、1
5%-25% SDS-ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、さらにそのゲ
ルからPVDF膜上(Amersham pharmacia biotech
30 社)に転写する。次に、該PVDF膜をブロックエース(雪印乳業)で1時間

ブロッキングし、0.05% Tween 20 を含むPBS (PBS-T) 中で抗FLAG モノクローナル抗体 ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$; Kodak社) と2時間反応させる。PBS-Tで3回洗浄後、PBS-T中で、西洋ワサビ過酸化酵素標識抗マウス IgGヤギ抗体 (Amersham pharmacia biotech社; 5000倍希釈) と1時間反応する。PBS-Tで5回洗浄後、ECL plus 発色キット (Amersham pharmacia biotech社) およびECL film (Amersham pharmacia biotech社) を用いて該融合タンパク質に対応する化学発光を検出する。

10 また、該融合タンパク質の精製は、上記COS7細胞への遺伝子導入実験をスケールアップし、大量調製した該培養上清またはRIPA緩衝液 (150mM NaCl , 1% Nonidet P-40 (NP-40), 0.1% SDS, 0.5% デオキシコール酸ナトリウム, 40mM トリス塩酸 (pH 7.5)) を用いた細胞粗抽出液より、抗FLAGモノクローナル抗体M2 (シグマ社) をカラムに結合したアフィニティクロマトグラフィーにて行う。

15 このようにして得られる目的タンパク質は各種生物活性の検定に用いるが、血管新生への影響を調べる一つの評価系としては、例えば血管新生キット (クラボウ) により検定を行う。

20 産業上の利用可能性

 本発明のタンパク質およびそれをコードするDNAは、例えば、骨・軟骨・関節疾患、癌 (悪性腫瘍)、前記以外の病的血管新生、胎児発育不全、臓器不全、消化管障害、外分泌障害などの疾病の治療・予防剤として使用することができる。また、本発明のタンパク質は、本発明のタンパク質の活性を促進もしくは阻害する化合物またはその塩のスクリーニングのための試薬として有用である。さらに、本発明のタンパク質に対する抗体は、本発明のタンパク質を特異的に認識することができるので、被検液中の本発明のタンパク質の定量などに使用することができる。

請求の範囲

1. 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩。
- 5 2. 請求項1記載のタンパク質の部分ペプチドまたはその塩。
3. 配列番号：2で表わされるアミノ酸配列を有する請求項2記載の部分ペプチドまたはその塩。
4. 配列番号：3で表わされるアミノ酸配列を有する請求項2記載の部分ペプチドまたはその塩。
- 10 5. 請求項1記載のタンパク質または請求項2記載の部分ペプチドをコードするDNAを含有するDNA。
6. 配列番号：4で表される塩基配列を含有する請求項5記載のDNA。
7. 配列番号：5で表される塩基配列を含有する請求項5記載のDNA。
8. 配列番号：6で表される塩基配列を含有する請求項5記載のDNA。
- 15 9. 請求項1記載のタンパク質または請求項2記載の部分ペプチドをコードするDNAを含有する組換えベクターで形質転換された形質転換体。
10. 請求項1記載のタンパク質または請求項2記載の部分ペプチドをコードするDNAを含有する組換えベクターで形質転換された形質転換体を培養し、該タンパク質または該部分ペプチドを生成せしめることを特徴とする、請求項
- 20 1記載のタンパク質もしくは請求項2記載の部分ペプチドまたはその塩の製造法。
11. 請求項1記載のタンパク質もしくは請求項2記載の部分ペプチドまたはその塩に対する抗体。
12. 請求項1記載のタンパク質もしくは請求項2記載の部分ペプチドまたは
- 25 その塩を用いることを特徴とする、請求項1記載のタンパク質もしくは請求項2記載の部分ペプチドまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法。
13. 請求項1記載のタンパク質もしくは請求項2記載の部分ペプチドまたはその塩を含有してなる、請求項1記載のタンパク質もしくは請求項2記載の部分ペプチドまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩の
- 30

スクリーニング用キット。

- 1 4. 請求項 1 2 記載のスクリーニング方法または請求項 1 3 記載のスクリー
ニング用キットを用いて得られうる、請求項 1 記載のタンパク質もしくは請求
項 2 記載の部分ペプチドまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物ま
5 たはその塩。
- 1 5. 請求項 1 2 記載のスクリーニング方法または請求項 1 3 記載のスクリー
ニング用キットを用いて得られうる、請求項 1 記載のタンパク質もしくは請求
項 2 記載の部分ペプチドまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物ま
たはその塩を含有してなる医薬。
- 10 1 6. 請求項 1 1 記載の抗体を含有してなる診断剤。
- 1 7. 請求項 1 記載のタンパク質もしくはその塩または請求項 2 記載の部分ペ
プチドもしくはその塩を含有してなる医薬。
- 1 8. 骨・軟骨・関節疾患、癌、病的血管新生、胎児発育不全、臓器不全、消
化管障害または外分泌障害の治療・予防剤である請求項 1 7 記載の医薬。
- 15 1 9. 請求項 1 記載のタンパク質もしくはその塩または請求項 2 記載の部分ペ
プチドもしくはその塩を投与することを特徴とする骨・軟骨・関節疾患、癌、
病的血管新生、胎児発育不全、臓器不全、消化管障害または外分泌障害の治療・
予防方法。
- 2 0. 請求項 1 記載のタンパク質もしくはその塩または請求項 2 記載の部分ペ
20 プチドもしくはその塩を含有してなる骨・軟骨・関節疾患、癌、病的血管新生、
胎児発育不全、臓器不全、消化管障害または外分泌障害の治療・予防剤を製造
するための請求項 1 記載のタンパク質もしくはその塩または請求項 2 記載の
部分ペプチドもしくはその塩の使用。

☒ 1

GGAATTCGCCCTTGTGGTCTCTCAGTCCTCTCAAAGCAAGGAAAGAGTACTGTGTGCTGAGAGACCATGGCAAAG 75
MetAlaLys

AATCCTCCAGAGAATTGTGAAGACTGTCACATTCTAAATGCAGAAGCTTTTAAATCCAAGAAAATATGTAAATCA 150
AsnProProGluAsnCysGluAspCysHisIleLeuAsnAlaGluAlaPheLysSerLysLysIleCysLysSer

CTTAAGATTGTGGACTGGTGTGGTATCCTGGCCCTAACTCTAATTGCTCTGTTTGGGGGAGCAAGCACTTC 225
LeuLysIleCysGlyLeuValPheGlyIleLeuAlaLeuThrLeuIleValLeuPheTrpGlySerLysHisPhe

TGGCCGGAGGTACCCAAAAAGCCTATGACATGGAGCACACTTTCTACAGCAATGGAGAGAAGAAGATTAC 300
TrpProGluValProLysLysAlaTyrAspMetGluHisThrPheTyrSerAsnGlyGluLysLysLysIleTyr

ATGGAAATTGATCCTGTGACCAGAACTGAAATATTGAGAAGCGGAAATGGCACTGATGAAACATTGGAAGTACAC 375
MetGluIleAspProValThrArgThrGluIlePheArgSerGlyAsnGlyThrAspGluThrLeuGluValHis

GACTTTAAAAACGGATACACTGGCATCTACTTCGTGGGTCTTCAAAAATGTTTATCAAACTCAGATTAAAGTG 450
AspPheLysAsnGlyTyrThrGlyIleTyrPheValGlyLeuGlnLysCysPheIleLysThrGlnIleLysVal

ATTCCTGAATTTTCTGAACCAGAAGAGGAAATAGATGAGAATGAAGAAATTAACCAACTTTCTTTGAACAGTCA 525
IleProGluPheSerGluProGluGluGluIleAspGluAsnGluGluIleThrThrThrPhePheGluGlnSer

GTGATTTGGGTCCCAGCAGAAAAGCCTATTGAAAACCGAGATTTCTTAAAAATTCAAAATTCTGGAGATTGT 600
ValIleTrpValProAlaGluLysProIleGluAsnArgAspPheLeuLysAsnSerLysIleLeuGluIleCys

GATAACGTGACCATGTATTGGATCAATCCCACTCTAATATCAGTTTCTGAGTTACAAGACTTTGAGGAGGAGGGA 675
AspAsnValThrMetTyrTrpIleAsnProThrLeuIleSerValSerGluLeuGlnAspPheGluGluGluGly

GAAGATCTTCACTTCTGCCAACGAAAAAAGGGATTGAACAAATGAACAGTGGGTGGTCCCTCAAGTGAAA 750
GluAspLeuHisPheProAlaAsnGluLysLysGlyIleGluGlnAsnGluGlnTrpValValProGlnValLys

GTAGAGAAGACCCGTACGCCAGACAAGCAAGTGAGGAAGAACTTCCAATAAATGACTATACTGAAAATGGAATA 825
ValGluLysThrArgHisAlaArgGlnAlaSerGluGluGluLeuProIleAsnAspTyrThrGluAsnGlyIle

GAATTTGATCCCATGCTGGATGAGAGAGGTTATTGTTGATTTACTGCCGTGAGGCAACCGCTATTGCCGCCGC 900
GluPheAspProMetLeuAspGluArgGlyTyrCysCysIleTyrCysArgArgGlyAsnArgTyrCysArgArg

GTCTGTGAACCTTTACTAGGCTACTACCCATATCCATACTGCTACCAAGGAGGACGAGTCATCTGTCGTGTCATC 975
ValCysGluProLeuLeuGlyTyrTyrProTyrProTyrCysTyrGlnGlyGlyArgValIleCysArgValIle

ATGCCTTGTAACCTGGTGGGTGGCCCGCATGCTGGGGAGGGTCTAATAGGAGGTTTGAGCTCAAATGCTTAACTG 1050
MetProCysAsnTrpTrpValAlaArgMetLeuGlyArgVal

CTGGCAACATATAATAATGCATGAAGGGCGAATTC 1086

[illegible]

图 3

Nchm.pro	C G D N V T M Y W I N P	- - - - - T L I S V S E L Q D F E E G E D L	206
CHM1_HUMAN.pro	C G D L P I F W L K P	T Y P K E I Q R E R R E V V R K I V	221
CHM1_BOVIN.pro	C G D L P I F W L K P	T Y P K E I Q R E R R E L V R K I V	221
CHM1_RABBIT.pro	C G D L P I F W L K P	T Y P K E I Q R E R R E V V R K I T V	221
CHM1_RAT.pro	C G D L P I F W L K P	M Y P K E I P R E R R E V V R S S A	221
Nchm.pro	H F P A N E K K G	- I E Q N E Q W V V P Q V K V E K T R H A R Q A S E E	241
CHM1_HUMAN.pro	- P T T T K R R P	- H S G P R S N P G A G R L N N E T R P S V Q E D S Q A F N P	258
CHM1_BOVIN.pro	- T T T T K R R P	L R S G P Q G T P A P G R P N N G T R P S V Q E D A E P F N P	259
CHM1_RABBIT.pro	- P T T T K R R P	- H S G P R G N P G P A R M R N D S R P S V Q E D S E P F N P	258
CHM1_RAT.pro	- P S T T R R R P	- H S E P R G N A G P G R L S N R T R P S V Q D D E E P F N P	258
Nchm.pro	E L P I N D Y T E N G I E	F D P P M L D E R G Y C C I Y C R R G N R Y C R R V C E	281
CHM1_HUMAN.pro	D N P Y H Q Q E G E S M T F	D P P R L D H E G I C C I E C R R S Y T H C Q K I C E	298
CHM1_BOVIN.pro	D N P Y H Q Q E G E S M T F	D P P R L D H E G I C C I E C R R S Y T H C Q K I C E	299
CHM1_RABBIT.pro	D N P Y H Q Q E G E S M T F	D P P R L D H E G I C C I E C R R S Y T H C Q K I C E	297
CHM1_RAT.pro	D N P Y H Q Q E G E S M T F	D P P R L D H E G I C C I E C R R S Y T H C Q K I C E	298
Nchm.pro	P L L G Y Y P Y P Y C Y Q G G R V I C R V I M P C N W W V A R M L G R V		317
CHM1_HUMAN.pro	P L G G Y Y P W P Y N Y Q G C R S A C R V I M P C S W W V A R I L G M V		334
CHM1_BOVIN.pro	P L G G Y Y H P W P Y N Y Q G C R S A C R V I M P C S W W V A R I L G M V		335
CHM1_RABBIT.pro	P L G G Y Y N P W P Y N Y Q G C R S A C R V I M P C S W W V A R I L G M V		333
CHM1_RAT.pro	P L G G Y Y P W P Y N Y Q G C R S A C R V I M P C S W W V A R I L G M V		334

SEQUENCE LISTING

<110> Takeda Chemical Industries, Ltd.

<120> Novel Protein and its Production

<130> 2681W00P

<150> JP 11-369946

<151> 1999-12-27

<150> JP 2000-45124

<151> 2000-02-17

<160> 10

<210> 1

<211> 317

<212> PRT

<213> Human

<400> 1

Met Ala Lys Asn Pro Pro Glu Asn Cys Glu Asp Cys His Ile Leu Asn

1 5 10 15

Ala Glu Ala Phe Lys Ser Lys Lys Ile Cys Lys Ser Leu Lys Ile Cys

20 25 30

Gly Leu Val Phe Gly Ile Leu Ala Leu Thr Leu Ile Val Leu Phe Trp

35 40 45

Gly Ser Lys His Phe Trp Pro Glu Val Pro Lys Lys Ala Tyr Asp Met

50 55 60

Glu His Thr Phe Tyr Ser Asn Gly Glu Lys Lys Lys Ile Tyr Met Glu

2/9

65	70	75	80
Ile Asp Pro Val Thr Arg Thr Glu Ile Phe Arg Ser Gly Asn Gly Thr			
	85	90	95
Asp Glu Thr Leu Glu Val His Asp Phe Lys Asn Gly Tyr Thr Gly Ile			
100	105	110	
Tyr Phe Val Gly Leu Gln Lys Cys Phe Ile Lys Thr Gln Ile Lys Val			
115	120	125	
Ile Pro Glu Phe Ser Glu Pro Glu Glu Glu Ile Asp Glu Asn Glu Glu			
130	135	140	
Ile Thr Thr Thr Phe Phe Glu Gln Ser Val Ile Trp Val Pro Ala Glu			
145	150	155	160
Lys Pro Ile Glu Asn Arg Asp Phe Leu Lys Asn Ser Lys Ile Leu Glu			
	165	170	175
Ile Cys Asp Asn Val Thr Met Tyr Trp Ile Asn Pro Thr Leu Ile Ser			
180	185	190	
Val Ser Glu Leu Gln Asp Phe Glu Glu Glu Gly Glu Asp Leu His Phe			
195	200	205	
Pro Ala Asn Glu Lys Lys Gly Ile Glu Gln Asn Glu Gln Trp Val Val			
210	215	220	
Pro Gln Val Lys Val Glu Lys Thr Arg His Ala Arg Gln Ala Ser Glu			
225	230	235	240
Glu Glu Leu Pro Ile Asn Asp Tyr Thr Glu Asn Gly Ile Glu Phe Asp			
	245	250	255

3/9

Pro Met Leu Asp Glu Arg Gly Tyr Cys Cys Ile Tyr Cys Arg Arg Gly

260

265

270

Asn Arg Tyr Cys Arg Arg Val Cys Glu Pro Leu Leu Gly Tyr Tyr Pro

275

280

285

Tyr Pro Tyr Cys Tyr Gln Gly Gly Arg Val Ile Cys Arg Val Ile Met

290

295

300

Pro Cys Asn Trp Trp Val Ala Arg Met Leu Gly Arg Val

305

310

315

<210> 2

<211> 269

<212> PRT

<213> Human

<400> 2

Gly Ser Lys His Phe Trp Pro Glu Val Pro Lys Lys Ala Tyr Asp Met

1

5

10

15

Glu His Thr Phe Tyr Ser Asn Gly Glu Lys Lys Lys Ile Tyr Met Glu

20

25

30

Ile Asp Pro Val Thr Arg Thr Glu Ile Phe Arg Ser Gly Asn Gly Thr

35

40

45

Asp Glu Thr Leu Glu Val His Asp Phe Lys Asn Gly Tyr Thr Gly Ile

50

55

60

Tyr Phe Val Gly Leu Gln Lys Cys Phe Ile Lys Thr Gln Ile Lys Val

65

70

75

80

Ile Pro Glu Phe Ser Glu Pro Glu Glu Glu Ile Asp Glu Asn Glu Glu

85

90

95

Ile Thr Thr Thr Phe Phe Glu Gln Ser Val Ile Trp Val Pro Ala Glu

100

105

110

Lys Pro Ile Glu Asn Arg Asp Phe Leu Lys Asn Ser Lys Ile Leu Glu

115

120

125

Ile Cys Asp Asn Val Thr Met Tyr Trp Ile Asn Pro Thr Leu Ile Ser

130

135

140

Val Ser Glu Leu Gln Asp Phe Glu Glu Glu Gly Glu Asp Leu His Phe

145

150

155

160

Pro Ala Asn Glu Lys Lys Gly Ile Glu Gln Asn Glu Gln Trp Val Val

165

170

175

Pro Gln Val Lys Val Glu Lys Thr Arg His Ala Arg Gln Ala Ser Glu

180

185

190

Glu Glu Leu Pro Ile Asn Asp Tyr Thr Glu Asn Gly Ile Glu Phe Asp

195

200

205

Pro Met Leu Asp Glu Arg Gly Tyr Cys Cys Ile Tyr Cys Arg Arg Gly

210

215

220

Asn Arg Tyr Cys Arg Arg Val Cys Glu Pro Leu Leu Gly Tyr Tyr Pro

225

230

235

240

Tyr Pro Tyr Cys Tyr Gln Gly Gly Arg Val Ile Cys Arg Val Ile Met

245

250

255

Pro Cys Asn Trp Trp Val Ala Arg Met Leu Gly Arg Val

5/9

260

265

<210> 3

<211> 103

<212> PRT

<213> Human

<400> 3

Gly Ile Glu Gln Asn Glu Gln Trp Val Val Pro Gln Val Lys Val Glu

1 5 10 15

Lys Thr Arg His Ala Arg Gln Ala Ser Glu Glu Glu Leu Pro Ile Asn

20 25 30

Asp Tyr Thr Glu Asn Gly Ile Glu Phe Asp Pro Met Leu Asp Glu Arg

35 40 45

Gly Tyr Cys Cys Ile Tyr Cys Arg Arg Gly Asn Arg Tyr Cys Arg Arg

50 55 60

Val Cys Glu Pro Leu Leu Gly Tyr Tyr Pro Tyr Pro Tyr Cys Tyr Gln

65 70 75 80

Gly Gly Arg Val Ile Cys Arg Val Ile Met Pro Cys Asn Trp Trp Val

85 90 95

Ala Arg Met Leu Gly Arg Val

100

<210> 4

<211> 951

<212> DNA

<213> Human

<400> 4

ATGGCAAAGA ATCCTCCAGA GAATTGTGAA GACTGTCACA TTCTAAATGC AGAAGCTTTT 60
AAATCCAAGA AAATATGTAA ATCACTTAAG ATTTGTGGAC TGGTGTGTTGG TATCCTGGCC 120
CTAACTCTAA TTGTCCTGTT TTGGGGGAGC AAGCACTTCT GGCCGGAGGT ACCCAAAAAA 180
GCCTATGACA TGGAGCACAC TTTCTACAGC AATGGAGAGA AGAAGAAGAT TTACATGGAA 240
ATTGATCCTG TGACCAGAAC TGAAATATTC AGAAGCGGAA ATGGCACTGA TGAAACATTG 300
GAAGTACACG ACTTTAAAAA CGGATACACT GGCATCTACT TCGTGGGTCT TCAAAAATGT 360
TTTATCAAAA CTCAGATTAA AGTGATTCTT GAATTTTCTG AACCGAAGA GGAAATAGAT 420
GAGAATGAAG AAATTACCAC AACTTTCTTT GAACAGTCAG TGATTGCGG CCCAGCAGAA 480
AAGCCTATTG AAAACCGAGA TTTTCTTAAA AATTCCAAAA TTCTGGAGAT TTGTGATAAC 540
GTGACCATGT ATTGGATCAA TCCCACTCTA ATATCAGTTT CTGAGTTACA AGACTTTGAG 600
GAGGAGGGAG AAGATCTTCA CTTTCCTGCC AACGAAAAAA AAGGGATTGA ACAAATGAA 660
CAGTGGGTGG TCCCTCAAGT GAAAGTAGAG AAGACCCGTC ACGCCAGACA AGCAAGTGAG 720
GAAGAACTTC CAATAAATGA CTATACTGAA AATGGAATAG AATTGATCC CATGCTGGAT 780
GAGAGAGGTT ATTGTTGTAT TTA CTGCGGT CGAGGCAACC GCTATTGCCG CCGCGTCTGT 840
GAACCTTTAC TAGGCTACTA CCCATATCCA TACTGCTACC AAGGAGGACG AGTCATCTGT 900
CGTGTCA TCA TGCCTTGTA CTGGTGGGTG GCCCGCATGC TGGGGAGGGT C 951

<210> 5

<211> 807

<212> DNA

<213> Human

<400> 5

GGGAGCAAGC ACTTCTGGCC GGAGGTACCC AAAAAAGCCT ATGACATGGA GCACACTTTC 60
TACAGCAATG GAGAGAAGAA GAAGATTTAC ATGGAAATTG ATCCTGTGAC CAGAACTGAA 120
ATATTCAGAA GCGGAAATGG CACTGATGAA ACATTGGAAG TACACGACTT TAAAAACGGA 180
TACACTGGCA TCTACTTCGT GGGTCTTCAA AAATGTTTTA TCAAACTCA GATTAAAGTG 240
ATTCTGAAT TTTCTGAACC AGAAGAGGAA ATAGATGAGA ATGAAGAAAT TACCACAACT 300
TTCTTTGAAC AGTCAGTGAT TTGGGTCCCA GCAGAAAAGC CTATTGAAAA CCGAGATTTT 360
CTTAAAAATT CCAAATTCT GGAGATTGT GATAACGTGA CCATGTATTG GATCAATCCC 420
ACTCTAATAT CAGTTTCTGA GTTACAAGAC TTTGAGGAGG AGGGAGAAGA TCTTCACTTT 480
CCTGCCAACG AAAAAAAGG GATTGAACAA AATGAACAGT GGGTGGTCCC TCAAGTGAAA 540
GTAGAGAAGA CCCGTCACGC CAGACAAGCA AGTGAGGAAG AACTTCCAAT AAATGACTAT 600
ACTGAAAATG GAATAGAATT TGATCCCATG CTGGATGAGA GAGGTTATTG TTGTATTTAC 660
TGCCGTCGAG GCAACCGCTA TTGCCGCCGC GTCTGTGAAC CTTTACTAGG CTACTACCCA 720
TATCCATACT GCTACCAAGG AGGACGAGTC ATCTGTCGTG TCATCATGCC TTGTAAGTGG 780
TGGGTGGCCC GCATGCTGGG GAGGGTC 807

<210> 6

<211> 309

<212> DNA

<213> Human

<400> 6

GGGATTGAAC AAAATGAACA GTGGGTGGTC CCTCAAGTGA AAGTAGAGAA GACCCGTCAC 60
GCCAGACAAG CAAGTGAGGA AGAACTTCCA ATAAATGACT AACTGAAAA TGGAATAGAA 120
TTTGATCCCA TGCTGGATGA GAGAGGTTAT TGTTGTATTT ACTGCCGTCG AGGCAACCGC 180
TATTGCCGCC GCGTCTGTGA ACCTTTACTA GGCTACTACC CATATCCATA CTGCTACCAA 240

GGAGGACGAG TCATCTGTCG TGTCATCATG CCTTGTAAC T GGTGGGTGGC CCGCATGCTG 300

GGGAGGGTC

309

<210> 7

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 7

TCAGCAGTGG TCTCTCAGTC CTCTCA

26

<210> 8

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 8

ACAAGTAATT CTGGAGAGCT GGCTACCA

28

<210> 9

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 9

CGAATTCCCA CCATGGGGAG CAAGCACTTC TGGCCGGAGG TAC

43

<210> 10

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 10

GTACAGTCGA CGACCCTCCC CAGCATGCGG GCCACCCA

38

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/09236

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/12, C07K14/475, C07K16/18, A61K38/17, A61K45/00, A61P19/00, A61P19/02, A61P43/00, A61P1/00, A61P35/00, G01N33/53, G01N33/50, G01N33/15

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/12, C07K14/475, C07K16/18, A61K38/17, A61K45/00, A61P19/00, A61P19/02, A61P43/00, A61P1/00, A61P35/00, G01N33/53, G01N33/50, G01N33/15

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

SwissProt/PIR/GeneSeq/Genbank,
MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX PA	WO, 00/29579, A1 (ZYMOGENETICS INC), 25 May, 2000 (25.05.00) & AU, 200016222, A	1-11, 16-18, 20 12-15
PX	WO, 00/43495, A2 (HUMAN GENOME SCI INC), 27 July, 2000 (27.07.00) & AU, 200032087, A	1-18, 20
PX PA	WO, 00/12708, A2 (GENENTECH INC, ALCEDO INC, INT BUSINESS MACHINES CORP), 09 March, 2000 (09.03.00) & AU, 9955908, A & US, 6144037, A	1-17 18, 20
A	Shukunami C., et al., "Expression of cartilage-specific functional matrix chondromodulin-1 mRNA in rabbit growth plate chondrocytes and its responsiveness to growth stimuli in vitro.", Biochem. Biophys. Res. Commun. (1998), Vol.249, pp.885-890	1-18, 20

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier document but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
13 March, 2001 (13.03.01)

Date of mailing of the international search report
27 March, 2001 (27.03.01)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/09236

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Neame PJ., et al., "An 18-kDa glycoprotein from bovine nasal cartilage. Isolation and primary structure of small, cartilage-derived glycoprotein.", J. Biol. Chem. (1990), Vol.265, No.17, pp.9628-9633	1-18,20
A	EP, 473080, A (MITSUBISHI KASEI CORP), 04 March, 1992 (04.03.92) (Family: none)	1-18,20
A	Hiraki Y. et al., "Molecular cloning of human chondromodulin-1, a cartilage-derived growth modulating factor, and its expression in CHinese hamuster ovary cells.", Eur. J. Biochem. (March 1999), Vol.260, No.3, pp.869-878	1-18,20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/09236

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:


1. ☒ Claims Nos.: 19
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claim 19 pertains to methods for treatment of the human body by therapy and thus relates to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))			
Int. Cl ⁷ C12N15/12, C07K14/475, C07K16/18, A61K38/17, A61K45/00, A61P19/00, A61P19/02, A61P43/00, A61P1/00, A61P35/00, G01N33/53, G01N33/50, G01N33/15			
B. 調査を行った分野			
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))			
Int. Cl ⁷ C12N15/12, C07K14/475, C07K16/18, A61K38/17, A61K45/00, A61P19/00, A61P19/02, A61P43/00, A61P1/00, A61P35/00, G01N33/53, G01N33/50, G01N33/15			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの			
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) SwissProt/PIR/GeneSeq/Genbank, MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号	
P X P A	WO, 00/29579, A1 (ZYMOGENETICS INC) 25. 5月. 2000 (25. 05. 00) & AU, 200016222, A	1-11, 16-18, 20 12-15	
P X	WO, 00/43495, A2 (HUMAN GENOME SCI INC) 27. 7月. 2000 (27. 07. 00) & AU, 200032087, A	1-18, 20	
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー		の日の後に公表された文献	
「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの		「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの	
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの		「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの	
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)		「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの	
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献		「&」 同一パテントファミリー文献	
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願			
国際調査を完了した日 13. 03. 01		国際調査報告の発送日 27.03.01	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 上條 肇  4N 9839 電話番号 03-3581-1101 内線 3488	

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P X P A	WO, 00/12708, A2 (GENENTECH INC, ALCEDO INC, INT BUSINESS MACHINES CORP) 9. 3月. 2000 (09. 03. 00) & AU, 9955908, A & US, 6144037, A	<u>1-17</u> 18, 20
A	Shukunami C., et. al., "Expression of cartilage-specific functional matrix chondromodulin-1 mRNA in rabbit growth plate chondrocytes and its responsiveness to growth stimuli in vitro. ", Biochem. Biophys. Res. Commun. (1998), Vol. 249, p. 885-890	1 - 18, 20
A	Neame PJ., et. al., "An 18-kDa glycoprotein from bovine nasal cartilage. Isolation and primary structure of small, cartilage-derived glycoprotein. ", J. Biol. Chem. (1990), Vol. 265, No. 17, p. 9628-9633	1 - 18, 20
A	EP, 473080, A (MITSUBISHI KASEI CORP) 4. 3月. 1992 (04. 03. 92) ファミリーなし	1 - 18, 20
A	Hiraki Y., et. al., "Molecular cloning of human chondromodulin-1, a cartilage-derived growth modulating factor, and its expression in Chinese hamster ovary cells. ", Eur. J. Biochem. (1999 Mar.), Vol. 260, No. 3, p. 869-878	1 - 18, 20

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 19 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、

請求項19は、人の身体の治療による処置方法に該当するものであるから、PCT 17条(2)(a) 及びPCT規則39(iv)の規定により、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。

2. ☐ 請求の範囲 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3. ☐ 請求の範囲 は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。